

Elektrophoretische Abscheidung von thermochromen und bioaktiven Nanopartikeln

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Katrin Wallat (geb. Spix)

geboren in Köln

Institut für Anorganische Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

Essen 2013

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2010 bis September 2013 am Lehrstuhl für Anorganische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. Matthias Epple, an der Universität Duisburg-Essen in Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Epple

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Siebers

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Rumann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Nanopartikel	3
2.2. Kolloidchemie	4
2.2.1. Stabilisierung kolloidaler Systeme	5
2.2.2. Alterung und Koagulation von Dispersionskolloiden	7
2.2.3. DLVO-Theorie	9
2.3. Elektrophoretische Abscheidung	10
2.4. Transfektion	18
2.5. Alginat	22
3. Methoden	25
3.1. Analytische Methoden	25
3.1.1. Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential	25
3.1.2. Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersive Röntgenspektroskopie	29
3.1.3. Röntgenpulverdiffraktometrie	31
3.1.4. UV/Vis-Spektroskopie	33
3.1.5. Dynamische Differenzkalorimetrie	34
3.1.6. Thermogravimetrische Analyse	35
3.1.7. Kritisch-Punkt-Trocknung	35
3.1.8. Atomabsorptionsspektroskopie	36
3.1.9. Fluoreszenzmikroskopie	37
4. Ergebnisse und Diskussion	39
4.1. Thermochrome quecksilberhaltige Verbindungen	39

4.2.	Synthese von quecksilberhaltigen Nanopartikeln	42
4.2.1.	Synthese und Funktionalisierung von Disilbertetraiodo- mercurat-Nanopartikeln (Ag_2HgI_4)	42
4.2.2.	Charakterisierung von funktionalisierten Ag_2HgI_4 - Nanopartikeln	44
4.2.3.	Synthese und Funktionalisierung von Quecksilberiodid- Nanopartikeln (HgI_2)	72
4.2.4.	Charakterisierung von HgI_2 -Nanopartikeln	73
4.3.	Synthese und Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln	91
4.3.1.	Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit Poly- ethylenimin (PEI)	91
4.3.2.	Calciumphosphat-Nanopartikel aus einer Wasservorlage . . .	92
4.3.3.	In Wasser redispergierbare Calciumphosphat-Nanopartikel .	93
4.3.4.	Calciumphosphat-Nanopartikel mit Fluoreszenzfarbstoffen .	93
4.3.5.	Biofunktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel	94
4.3.6.	Charakterisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln . . .	94
4.4.	Elektrophoretische Abscheidung von Calciumphosphat-Nanopartikeln	103
4.4.1.	Elektrophoretische Abscheidung mit einer Variation der Abscheide-Parameter	106
4.4.2.	Elektrophoretische Abscheidung mit einem kontinuierlichen Flussreaktor	114
4.4.3.	Elektrophoretische Abscheidung von biofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln	123
4.4.4.	Bestimmung der Schichtdicke	128
4.5.	Besiedlung von nanostrukturierten Oberflächen	134
4.6.	Zellaufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln	139
4.7.	Transfektion von Oberflächen	145
4.8.	Alginatebeads	157
4.8.1.	Beschichtung von Alginatebeads mit Nanopartikeln mittels Di- spersionen	159
4.8.2.	Beschichtung von Alginatebeads mit Nanopartikeln von einer elektrophoretisch beschichteten Oberfläche	163
5.	Zusammenfassung	169

Inhaltsverzeichnis

Literaturverzeichnis	xi
Abkürzungsverzeichnis	xix
A. Eidesstattliche Erklärung	xxi
B. Lebenslauf	xxiii
C. Vorträge und Publikationen	xxv
C.1. Publikationen	xxv
C.2. Nichtreferierte Publikationen und Abstracts	xxv
C.3. Vorträge (V) und Poster (P)	xxv
D. Danksagung	xxvii

1. Einleitung

Die elektrophoretische Abscheidung, als Verfahren zur Beschichtung von Oberflächen, mit Biomaterialien hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen.^[1] In diesem Zusammenhang gibt es verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für Beschichtungen, die in einem solchen Prozess gewonnen werden können. Implantatbeschichtungen spielen hierbei eine wichtige Rolle, da Biomaterialien seltener eine Immunantwort auslösen.^[2,3] Somit ist es möglich die Biokompatibilität von Implantaten zu erhöhen. Die Beschichtung führt zu einer besseren Gewebearbeitung des Implantats, da die Zellen vermehrt um das Implantat anwachsen.^[2]

In der Literatur werden verschieden Arten der elektrophoretischen Abscheidung beschrieben.^[1,4,5] Ein wichtiger Aspekt ist die Art des Lösungsmittels, in dem die abzuscheidenden Partikel in einer Dispersion vorliegen. Viele Arbeiten beschäftigen sich mit Abscheidungen aus Alkoholen. Hier sind als Beispiele die Arbeiten von H. Urch^[6] und M. Neumeier^[7] zu nennen. Neben diesen Abscheidungen gibt es auch wasserbasierte Abscheideverfahren, auf die in dieser Arbeit vermehrt eingegangen wird. Dieses Abscheideverfahren hat den Vorteil, dass DNA-Bestandteile, die in dieser Arbeit zur Biofunktionalisierung verwendet werden, nicht zerstört werden.

Das Einbringen von Fremd-DNA in eine Zelle wird Transfektion genannt. Mit Hilfe der Transfektion können Aussagen darüber getroffen werden, ob eine biofunktionalisierte Beschichtung unter verschiedenen Voraussetzungen erfolgreich war oder nicht. Dabei wurden vor allen Dingen die Partikelarten untersucht (Kapitel 4.7). Hierbei wurde zwischen aufgereinigten und nicht aufgereinigten Nanopartikeln unterschieden.

Die in dieser Arbeit gezeigten elektrophoretischen Abscheidungen beschäftigen sich mit verschiedenen Aspekten. Es werden die Parameter sowie der Einfluss des Partikelsystems auf die Abscheidung untersucht. Darüber hinaus werden die Bedingungen für eine optimale Abscheidung ermittelt (Kapitel 4.4.1). Eine weitere Unter-

1. Einleitung

suchung betrachtet den Prozess der elektrophoretischen Abscheidung. Dazu wurde ein kontinuierlicher Flussreaktor entwickelt. Die Wirkungsweise dieses Flussreaktors wird in Kapitel 4.4.2 näher betrachtet.

Das Verhalten von Zellen auf Nanostrukturen wird in Kapitel 4.5 untersucht. Die Besiedlung von nanostrukturierten Silicium-Substraten erfolgte vor und nach der elektrophoretischen Beschichtung mit Calciumphosphat-Nanopartikeln. Dabei wurde der Einfluss der Partikel auf die Zellen untersucht.

Als ein besonderer Aspekt wird in Kapitel 4.8 auf die Beschichtung von Alginate-beads eingegangen. Alginate bieten Vorzüge unter anderem, in der Wundheilung und der Medikamentenverabreichung.^[8]

Ein weiterer Teil dieser Arbeit behandelt die elektrophoretische Abscheidung von thermochromen quecksilberhaltigen Nanopartikeln (Kapitel 4.1). Es konnte schon in einer früheren Arbeit gezeigt werden^[9], dass die Phasenübergangstemperatur durch die Partikelgröße beeinflusst werden kann. Disilbertetraiodomercurat-Nanopartikel wurden schon eingehend untersucht. Zusätzlich werden in dieser Arbeit die Eigenschaften von Quecksilberiodid-Nanopartikeln näher betrachtet.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Nanopartikel

Nanopartikel sind definiert als Moleküle oder Teilchen in einem Größenbereich von 1 nm bis 100 nm, die oberste definierte Grenze liegt bei 1000 nm.^[10,11] Abhängig von der Art der Herstellung, können Nanopartikel in verschiedenen Morphologien vorkommen.^[11,12] Im Vergleich zu makroskopischen Materialien weisen Nanopartikel auf Grund ihrer Größe zum Teil völlig andere Eigenschaften auf.^[13,14] Nanopartikel zeichnen sich durch folgende chemische und physikalische Eigenschaften aus:

- höhere chemische Reaktivität durch große spezifische Oberfläche (Verhältnis von Teilchenoberfläche zum Partikel-Volumen)
- zunehmende Bedeutung der Oberflächenladung (DLVO-Theorie)
- geringer Einfluss von Massenkräften (Schwerkraft)
- zunehmender Einfluss von Oberflächenkräften (z. B. van-der-Waals-Kraft)
- thermodynamische Effekte (Brown'sche Molekularbewegung)

Durch die große spezifische Oberfläche erhöht sich der Einfluss der Oberflächeneigenschaften auf die Nanopartikel. Eine große Oberfläche sucht nach Kompensation, die durch Agglomeration bzw. Aggregation der Partikel erfolgen kann, wenn keine geeignete Stabilisierung, z.B. durch Polymeradsorption der Partikel, geschieht. Es gibt verschiedene Methoden, um Nanopartikel zu synthetisieren. Es wird zwischen *Top-Down*- und *Bottom-Up*-Verfahren unterschieden. Beim *Top-Down*-Verfahren werden physikalische Methoden angewandt, die ein Material zu Nanopartikeln zerkleinern, z.B. lithographische Verfahren.^[15] Beim *Bottom-Up*-Verfahren erfolgt die Herstellung von Nanopartikeln auf chemischem Weg.^[16] Dabei wird von molekularen oder ionischen Verbindungen ausgegangen. Beispiele für *Bottom-Up*-Verfahren sind die Sol-Gel-Methode, chemische Gasphasenabscheidung, Aerosol-

2. Theoretische Grundlagen

prozess, Elektrospinning und Mikroemulsionstechnik. Für welche Methode man sich entscheidet, hängt von der Art der Partikel ab, die man erhalten möchte. Um eine genau definierte und enge Partikelgrößenverteilung zu erhalten, eignen sich am besten Verfahren in Dispersion oder Verfahren der Selbstorganisation.

2.2. Kolloidchemie

Der Wissenschaftler Thomas Graham (1808-1869) definierte als erster den Begriff Kolloid als die Eigenschaft von Stoffen, durch Membranen zu diffundieren. Er stellte fest, dass Dispersionen durch eine Membran diffundieren, während andere Stoffe wie Leim, Stärke oder Gelatine zurückgehalten werden.^[17] Kolloide zeichnen sich durch eine leimartige, trübe Konsistenz aus. Daher auch der Name Kolloid (griechisch für Leim). In einem kolloidalen System sind Teilchen (Kolloide) in einem Dispersionsmedium gleichmäßig verteilt. Die disperse Phase sowie das Dispersionsmedium können in fester, flüssiger und gasförmiger Form vorliegen (Tabelle 2.1). Nach der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) wurde 1972 der Begriff Kolloid für Objekte benutzt, bei denen zumindest eine Dimension eine Länge im Bereich von 1 nm bis maximal 1000 nm besitzen.^[18] Die folgende Tabelle (2.1) nennt Beispiele für kolloidale Systeme und ihre Bezeichnung.

Tabelle 2.1.: Beispiele für kolloidale Systeme.^[19]

Bezeichnung	Disperse Phase	Dispersionsmittel	Beispiel
Festes Aerosol	Feststoff	Gas	Tabakrauch, Staub
Feste Sole	Feststoff	Feststoff	Blaues Steinsalz, Goldrubinglas
Suspension	Feststoff	Flüssigkeit	Kolloide in Gewässern
Feste Emulsion	Flüssigkeit	Feststoff	Opal, Perlen
Emulsion	Flüssigkeit	Flüssigkeit	Milch, Mayonnaise
Flüssige Aerosole	Flüssigkeit	Gas	Nebel, Haarspray
Feste Schäume	Gas	Feststoff	Bimsstein, Styropor
Flüssige Schäume	Gas	Flüssigkeit	Seifenschaum

2.2.1. Stabilisierung kolloidaler Systeme

Nach Staudinger wurden kolloidale Systeme entsprechend der Bindungsart zwischen den Atomen eingeteilt. Die Einteilung erfolgt in Dispersionskolloide, Molekülkolloide und Mizellen- bzw. Assoziationskolloide (Abbildung 2.1).^[20] Dispersionskolloide sind hydrophobe Kolloide, polydispers und polyform. Sie sind thermodynamisch instabil und neigen zur Auflösung oder Aggregation. Um das Kolloid zu stabilisieren, ist eine elektrostatische oder sterische Stabilisierung mit Schutzkolloiden notwendig. Molekülkolloide hingegen sind hydrophile Kolloide und thermodynamisch stabil. Sie bestehen aus Makromolekülen oder Polymeren, die Bindung der Atome erfolgt über Hauptvalenzen. Die Form ist geknäult und die Kolloide sind polydispers. Kolloide mit einem besonderen Molekülaufbau werden als Mizellen- bzw. Assoziationskolloide bezeichnet. Es sind hydrophile Systeme, die thermodynamisch stabil sind. Die Mizellen bilden sich erst ab einer bestimmten Konzentration, werden beim Auflösen einer reinen Substanz gebildet und brauchen keine Schutzkolloide oder andere Stabilisatoren. Sie entstehen durch Selbstorganisation und sind unterschiedlich in ihrer Gestalt und Größe.

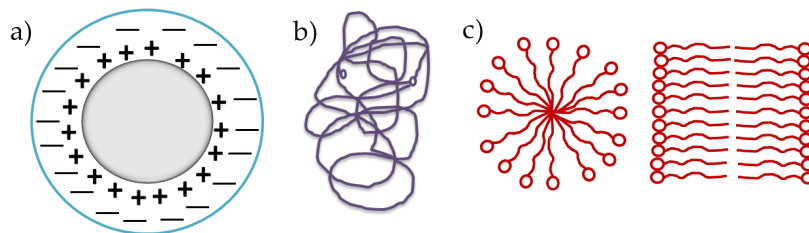


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung der Kolloide nach Staudinger.
a) Dispersionskolloid, b) Molekülkolloid, c) Mizellen- bzw. Assoziationskolloid.

Die Stabilität kolloidaler Systeme ist abhängig von ihrer thermodynamischen und kinetischen Stabilität. Dispersionskolloide sind thermodynamisch instabil, da sie bei konstanter Temperatur dazu tendieren, den Zustand geringster freier Energie einzunehmen. Die Erhöhung der freien Energie in einem System ist die Folge der Erhöhung der spezifischen Oberfläche der einzelnen Teilchen durch den Übergang von einer makroskopischen Phase zur kolloidalen Phase. Es wirken verschiedene Wechselwirkungskräfte zwischen den Teilchen in einem kolloidalen System. Die anziehenden Wechselwirkungen sind van-der-Waals Kräfte, diese beruhen auf Wechselwirkungen zwischen fluktuierenden, elektrischen Dipolen. Der Aufbau einer elektrostatischen Doppelschicht auf der Oberfläche der Teilchen zeichnet die abstoßen-

2. Theoretische Grundlagen

den Wechselwirkungen aus. Das Dispersionsmittel liefert die Gegenionen, die sich an der geladenen Oberfläche eines kolloidalen Teilchens anlagern. Die Oberflächenladung und die Ionen aus der Lösung bilden die elektrostatische Doppelschicht rund um das Teilchen aus (Abbildung 2.2). Die Doppelschicht besteht aus einer starren, an der Partikeloberfläche adsorbierten Schicht, der Stern-Schicht, sowie einer diffusen Schicht, der Scherschicht. Die diffuse Schicht zeichnet sich durch locker an die Partikel gebundene Ionen aus. Auf diese Weise entsteht eine Raumladungszone, die sich symmetrisch um das Teilchen aufbaut. Die diffuse Schicht befindet sich im Gleichgewicht mit der Lösung, bewegen sich die Teilchen durch das Medium, bewegt sich ein Teil der Scherschicht mit den Teilchen mit. Durch Reibung wird ein Teil der diffusen Schicht abgeschert, dadurch ist das Teilchen nicht mehr elektrisch neutral und besitzt ein Potential. Dieses Potential an der Abschergrenze wird als Zetapotential bezeichnet und ist ein Maß für die elektrostatische Stabilität der Teilchen.^[21]

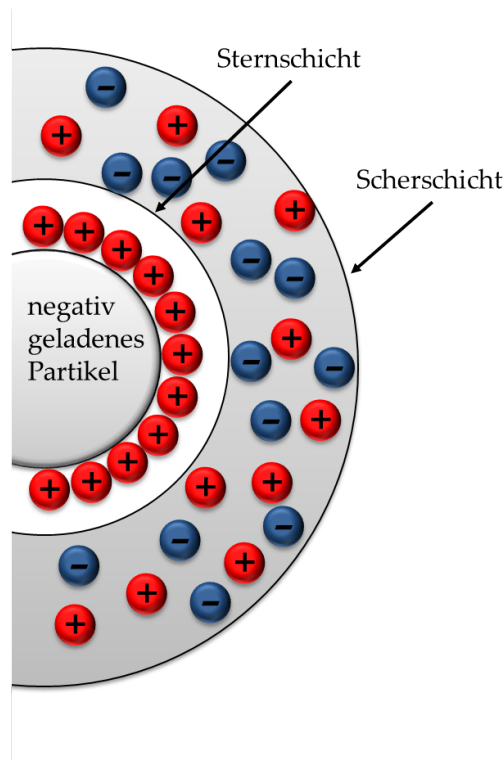


Abbildung 2.2.: Schematische Darstellung der elektrostatischen Doppelschicht.

Eine weitere Möglichkeit, Nanopartikel zu stabilisieren, ist die Adsorption von Makromolekülen, Tensiden und Polymeren. Diese Art der Stabilisierung wird sterische Stabilisierung genannt. Die adsorbierten Moleküle verhindern eine Annäherung der Partikel, indem sie eine Barriere bilden, die die Partikel voneinander fern hält (Ab-

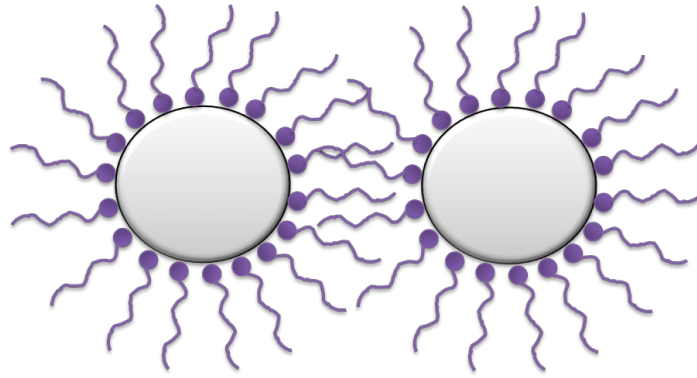


Abbildung 2.3.: Schematische Darstellung der sterischen Stabilisierung durch Polymeradsorption.

bildung 2.3). Die Abstoßung, die aus der starken Annäherung der Kolloide resultiert, ist entropisch bedingt. Dabei werden die in Kontakt geratenen Polymerschichten komprimiert und es verkleinert sich der Konfigurationsraum der Polymere. Die Polymere können dann nicht mehr so viele Konfigurationen annehmen wie freie, ungestörte Teilchen. In einer stabilen Dispersion stellt sich ein Gleichgewicht zwischen van-der-Waals-Kräften und entropischer Abstoßung ein. Ein wichtiger Punkt für die Stabilisierung mit Polymeren ist die Polymerkonzentration. Die Stabilisierung erfolgt bei einer bestimmten Konzentration an Polymer; zu viel oder zu wenig Polymer begünstigen eher die Flockung bzw. Destabilisierung des Systems.^[22] In Abbildung 2.4 ist die Polymerflockung in einer Kolloiddispersion bei unterschiedlichen Polymerkonzentrationen dargestellt.

2.2.2. Alterung und Koagulation von Dispersionskolloiden

Die Stabilität einer Dispersion ist auch abhängig von äußeren Einflüssen, die auf sie wirken. Daher ist eine stabile Dispersion nicht unbegrenzt stabil. Beim Alterungsprozess eines kolloidalen Systems strebt die Dispersion eine Entmischung des Systems in ihre festen und flüssigen Bestandteile an. Der thermodynamisch stabilste Zustand soll dabei erreicht werden. Die Geschwindigkeit, mit der ein System altert, ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie Löslichkeit und Größe der kolloidalen Partikel, Grenzflächenspannung, Diffusionskoeffizienten und Temperatur. Die Löslichkeit für kleinere Partikel ist höher als für größere. Die gelösten Ionen oder

2. Theoretische Grundlagen

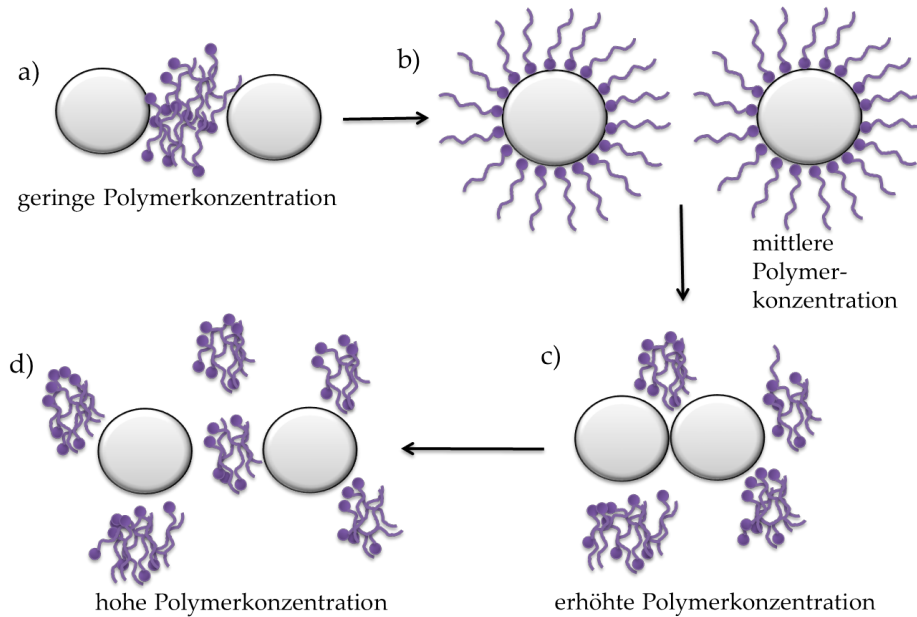


Abbildung 2.4.: Schematische Darstellung der Polymerflockung in einer kolloidalen Dispersion. a) Überbrückungsflockung, b) Sterische Stabilisierung, c) Verminderungsflockung, d) Verminderungsstabilisierung.

Moleküle lagern sich an die größeren Partikel an und lassen diese wachsen. Für die Alterungsgeschwindigkeit $\frac{dm}{dt}$ gilt:^[23]

$$\frac{dm}{dt} = \frac{qDc_0}{\delta} \exp \left[\frac{\sigma_{sl}}{f(r_1)RT} \right] - \exp \left[\frac{\sigma_{sl}}{f(r_2)RT} \right] \quad (2.1)$$

mit

D = Diffusionskoeffizient

c_0 = Löslichkeit der makroskopischen Phase

σ_{sl} = Grenzflächenspannung

δ = Viskosität

r_1, r_2 = Radien der kolloiden Partikel

T = Temperatur

Wenn man diese Gleichung als Grundlage nimmt, dürfen streng monodisperse Systeme nicht altern. In monodispersen Systemen haben alle Partikel in der Dispersion die gleiche Größe. In der Praxis existiert kein streng monodisperses System, sodass jedes System altert. Je monodisperser jedoch ein System ist, desto langsamer al-

2. Theoretische Grundlagen

tert es.^[24] Der Alterungsprozess kann durch Erhöhung der Temperatur beschleunigt werden, da hierdurch die Löslichkeit und der Diffusionskoeffizient zunehmen.^[25] Dieser Zusammenhang ist als Ostwald-Reifung bekannt. Die Alterung eines kolloidalen Systems ist ein natürlicher Prozess, der zum Zerfall der Dispersion führt. Das Ende ist erreicht, wenn eine vollständige Entmischung beider Phasen vorliegt.

Durch Elektrolytzugabe kann der Alterungsprozess beschleunigt werden, da der Elektrolyt das kolloidale System destabilisiert. Dies wird als Elektrolytkoagulation bezeichnet. Die Erhöhung der Temperatur fördert die Koagulation, da die Brown'sche Molekularbewegung der Partikel erhöht wird. Die Partikel lagern sich bei der Koagulation zusammen, wobei ihre Gestalt erhalten bleibt und bilden größere Agglomerate. Sie wird deshalb auch als Agglomeration bezeichnet. Die Koagulation ist irreversibel und kann nicht durch Redispersion rückgängig gemacht werden, wenn nachgeschaltete Prozesse wie Sinterung oder Rekristallisation eintreten. Am Ende des Koagulationsprozesses erhält man ein Koagulat, welches meist die Form eines Gels besitzt. Für reversible Koagulation gilt das Sol-Gel-Gleichgewicht.^[26]

2.2.3. DLVO-Theorie

Die DLVO-Theorie (benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek^[27]) befasst sich mit der theoretischen Beschreibung der Stabilität kolloidaler Systeme. Sie beschreibt die Stabilität eines kolloidalen Systems auf der Grundlage von attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen zwischen dispergierten Teilchen.

Die totale Wechselwirkungskraft wird durch die Überlagerung der Doppelschichtkräfte und der van-der-Waals-Kräfte erhalten. Des Weiteren ist es möglich, das gesamte Wechselwirkungspotential durch die Überlagerung der abstoßenden Doppelschicht-Potentiale und der anziehenden van-der-Waals-Potentiale zu erhalten. In Abbildung 2.5 sind die Potentialverläufe, die sich durch die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln ergeben, dargestellt. Der Graph zeigt den Verlauf des Potentials in Abhängigkeit des Partikelabstands. Es werden die attraktiven Wechselwirkungen (van-der-Waals-Anziehung), repulsiven Wechselwirkungen (Doppelschichtabstoßung) und die kombinierten Wechselwirkungen (gesamtes Wechselwirkungspotential) sowie die Minima und Maxima dargestellt. Liegt ein ausgeprägtes primäres Maximum (eine Energiebarriere) vor, so ist die Suspension stabil gegen Koagulation.^[28] Ein sekundäres Minimum im Potentialverlauf führt bei Suspensio-

2. Theoretische Grundlagen

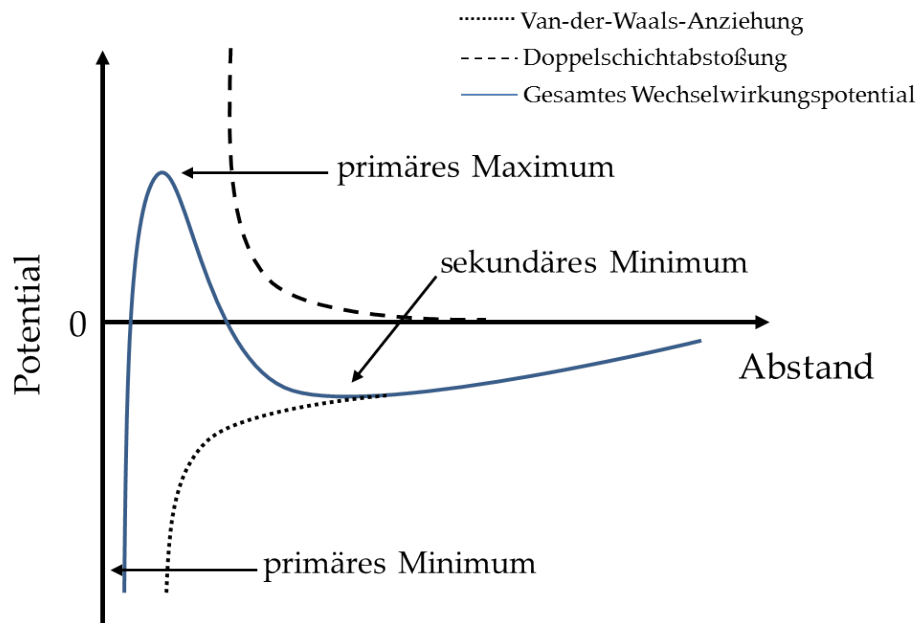


Abbildung 2.5.: Potentialverlauf der Wechselwirkung zwischen kolloidalen Partikeln in Abhängigkeit des Abstandes zwischen zwei Partikeln.

nen in der Regel zu einer Teilaggregation der Partikel, die Flockung ist aber meist reversibel. Der Grund für das sekundäre Minimum ist die größere Reichweite der van-der-Waals-Wechselwirkungen im Vergleich zu den elektrostatischen Wechselwirkungen. Wenn kein sekundäres Minimum vorliegt, kann die Suspension komplett koagulieren, falls das Potential negativ bleibt. Die Ionenstärke und die Oberflächenladung haben auch einen Einfluss auf die Koagulation, durch diese Faktoren kann die Höhe der Energiebarriere verändert werden.^[29] Eine hohe Oberflächenladung und eine geringe Ionenstärke führen zu einer hohen Stabilität der Dispersion. Die Vergrößerung des sekundären Minimums kann mit einer mittleren Ionenstärke herbeigeführt werden, dies führt aber nicht zu einer vollständigen Koagulation. Eine vollständige Koagulation kann nur mit einer hohen Ionenstärke und niedrigen Oberflächenladung erzielt werden.

2.3. Elektrophoretische Abscheidung

Die elektrophoretische Abscheidung (EPD; *electrophoretic deposition*) wurde im Jahr 1808 vom russischen Wissenschaftler Reuss entdeckt.^[30] Er beobachtete die Bewegung von Tonpartikeln in Wasser unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes.^[31]

2. Theoretische Grundlagen

Im Jahre 1940 wurden die ersten Untersuchungen zur Schichtdicke der elektrophoretischen Abscheidung gemacht. Hamaker beschrieb als erster mathematisch, wovon die elektrophoretische Abscheidung in Bezug auf die Schichtdicke abhängig ist. Die Masse des abgeschiedenen Materials ist abhängig von der Zeit, der Oberfläche der Elektrode, dem elektrischen Feld und der Konzentration der Lösung.^[32] Die elektrophoretische Abscheidung ist ein kolloidales Verfahren, welches in zwei Teilschritte unterteilt werden kann. Der erste Schritt ist die Wanderung der geladenen Teilchen in einer Suspension nach Anbringen eines elektrischen Feldes in Richtung der Gegenelektrode, der zweite Schritt ist die Abscheidung der Teilchen an diese Elektrode.^[33,34] Der schematische Aufbau einer EPD-Zelle ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

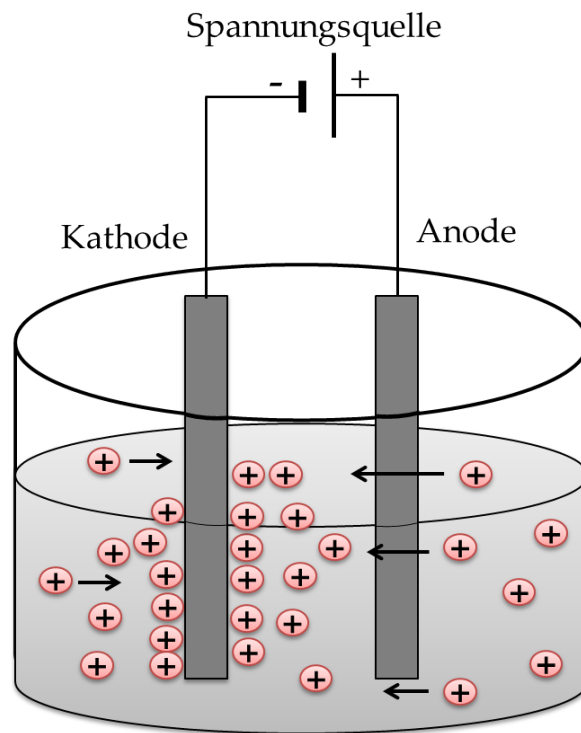


Abbildung 2.6.: EPD Zelle mit positiv geladenen Teilchen in einer stabilen Suspension.

Die Apparatur und die Suspensionsparameter sind die Prozessparameter, die Einfluss auf die elektrophoretische Abscheidung nehmen. Die Parameter der Apparatur beinhalten den Aufbau der Abscheidenzelle, das Elektrodenmaterial, die angelegte Spannung und die Abscheidedauer. Die Suspensionsparameter setzen sich aus der Partikelkonzentration, dem Zetapotential, der Viskosität und der Leitfähigkeit zusammen. Die Variation der Schichtdicke erfolgt über die Einstellung der Prozess-

2. Theoretische Grundlagen

parameter. Im Vergleich zu anderen Beschichtungsprozessen deckt EPD einen sehr weiten Bereich in Bezug auf die Schichtdicke ab, wie in Abbildung 2.7 dargestellt.

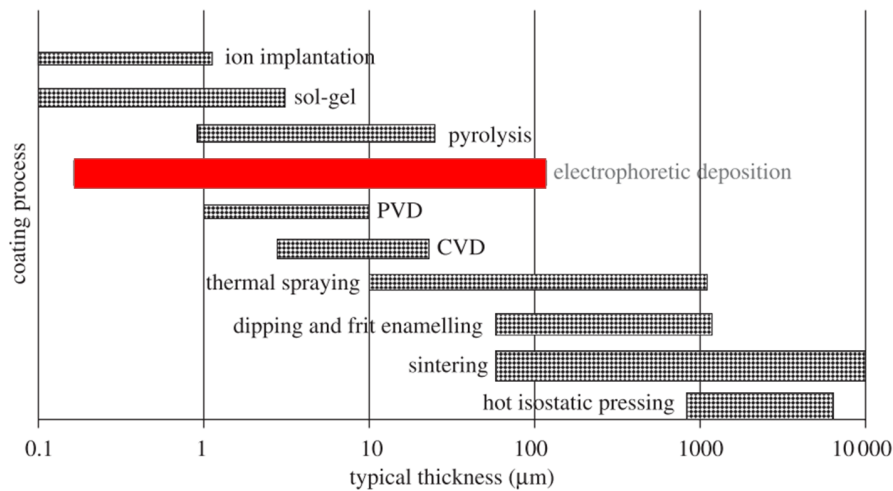


Abbildung 2.7.: Typische Schichtdicken, die mit unterschiedlichen Beschichtungsverfahren hergestellt wurden.^[1]

Unter Abschnitt 2.2.1 wurde beschrieben, dass Partikel, die elektrostatisch stabilisiert sind, eine diffuse Doppelschicht besitzen. Wird ein elektrisches Feld angelegt, bewegen sich die Gegenionen der diffusen Doppelschicht aufgrund ihrer entgegengesetzten Ladung zum Partikel in die entgegengesetzte Richtung zur elektrophoretisch bedingten Wanderung des Partikels. Dadurch wirkt eine Kraft in Form von Reibung durch die umgebenden Lösungsmittelmoleküle auf die Partikel.^[35] Auf kugelförmige kolloidale Partikel wirkt in einem elektrischen Feld die Kraft F_E .^[36]

$$F_E = z_i e E \quad (2.2)$$

mit

e = Elementarladung

z_i = Anzahl der Elementarladungen

E = elektrische Feldstärke

Für die Reibungskraft F_R , die auf ein Partikel wirkt, wird das Stokes'sche Gesetz herangezogen.^[37] Dieses beschreibt die Abhängigkeit der Reibungskraft sphäri-

2. Theoretische Grundlagen

scher Partikel von deren Radius, der Viskosität der Suspension und der Geschwindigkeit der Partikel.

$$F_R = 6\pi r \eta v \quad (2.3)$$

mit

r = Radius des Partikels

η = Viskosität der Suspension

v = Geschwindigkeit des Partikels

Die elektrophoretische Abbremsung der Partikel und die daraus folgende Reduzierung der Geschwindigkeit wird auch Retardation genannt.^[35] Einige Zeit nach Anlegen des elektrischen Feldes stellt sich ein Kräftegleichgewicht ein. Durch dieses Gleichgewicht ist es möglich, die Wanderungsgeschwindigkeit v der Partikel zu bestimmen. Dafür werden die Gleichungen 2.2 und 2.3 miteinander kombiniert.

Daraus ergibt sich für die Wanderungsgeschwindigkeit v der Partikel folgende Gleichung:^[35]

$$v = \frac{z_i e}{6\pi r \eta} E \quad (2.4)$$

Die Berechnung der Partikelgeschwindigkeit, die für Partikel jeder Form und Größe gültig ist, wurde 1918 von Smoluchowski aufgestellt.^[38] Die Theorie von Smoluchowski beschäftigt sich mit der Berechnung der Geschwindigkeit für nicht leitende Partikel. Eine Voraussetzung für die Gültigkeit der Gleichung ist die Dicke der Doppelschicht. Diese muss klein sein im Vergleich zum Radius des Partikels.

$$v = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} E \quad (2.5)$$

Die Geschwindigkeit des Partikels ist eine Funktion der Permittivität $\varepsilon = \varepsilon_r \varepsilon_0$, dem Zetapotential ζ der Suspension, dem reziproken Wert der Viskosität η der Suspension und der elektrischen Feldstärke E . Die Gleichung ist anwendbar, wenn hohe Elektrolytkonzentrationen vorhanden sind. Darin besteht auch der Unterschied zu Hückel. Smoluchowski und Hückel haben unterschiedliche Annahmen in Bezug auf

2. Theoretische Grundlagen

die Leitfähigkeit des Partikels und der Dicke der diffusen Doppelschicht aufgestellt. Nach Hückel und Smoluchowski ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel unabhängig von ihrem Radius. Es kommt zu einer Deformierung des elektrischen Feldes um das Teilchen, wenn die Leitfähigkeit des Teilchens kleiner ist, als die des umgebenen Mediums. Dadurch werden die Feldlinien um die Teilchen herum geleitet, was dazu führt, dass auf Ionen, die sich auf Feldlinien vor oder hinter dem Teilchen befinden, keine Kraft ausgeübt wird. Diese Ionen verlangsamen die Teilchen nicht, sie liefern also keinen Beitrag zur Retardation. Dieser Einfluss auf das elektrische Feld um die Teilchen wird umso geringer, je dünner die diffuse Doppelschicht ist. Smoluchowski berechnete dadurch eine größere Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen als Hückel. Sollten allerdings entgegengesetzte Verhältnisse von der Leitfähigkeit zum Medium herrschen, d.h. die Leitfähigkeit der Partikel ist größer als die des umgebenden Mediums, werden die Feldlinien nicht um das Teilchen herum geleitet, sondern in das Teilchen hineingezogen. Dies führt dann wiederum zu einer Erhöhung der Retardationskraft und zu einer Verlangsamung des Teilchens. Die berechnete Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen nach Hückel ist dadurch zu hoch.

Die Gleichungen von Smoluchowski und Hückel beschreiben Grenzfälle in der Teilchenbewegung, deshalb führte Henry im Jahre 1931 einen Faktor in die Formel von Hückel ein, um zu zeigen, welche Gleichung für welche Grenzfälle zu verwenden ist. Die Gleichung von Henry gilt für kugelförmige Partikel mit derselben Leitfähigkeit wie das umgebende Medium.^[39]

$$v = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} E f(\kappa a) \quad (2.6)$$

mit

κ = Ionenstärke der Lösung

a = Radius des geladenen Teilchens

Der Faktor $f(\kappa a)$ ist nicht nur abhängig von der Ionenstärke κ der Lösung, sondern auch vom Radius a des geladenen Teilchens. Der Debye-Hückel-Parameter κ gibt Auskunft über die reziproke Dicke der diffusen Doppelschicht. Wenn $\kappa a \Rightarrow \infty$, dann geht $f(\kappa a) \Rightarrow 1,5$ und man erhält nach Einsetzen in die Gleichung 2.6 den Grenzfall von Smoluchowski (dünne Doppelschicht). Wenn jedoch $\kappa a \Rightarrow 0$, dann geht $f(\kappa a) \Rightarrow 1$ und man erhält den Grenzfall von Hückel (dicke Doppelschicht). Henry fand

2. Theoretische Grundlagen

heraus, dass für bestimmte κa Werte gute Näherungen erzielt werden können, die einen Fehler geringer als einen Prozent aufweisen. Für einen κa Wert > 300 liefert die Gleichung von Smoluchowski eine gute Näherung, liegt der Wert $\kappa a < 0,5$ erhält man eine gute Näherung für die Hückel Gleichung.^[39,40]

Im Jahre 1948 erweiterte Henry seinen Faktor f um die Leitfähigkeit des Mediums λ_f und der Partikel λ_p . Der Faktor $f(\kappa a, \lambda_f/\lambda_p)$ berücksichtigt die Deformation des angelegten elektrischen Feldes aufgrund der unterschiedlichen Leitfähigkeiten von Medium und Partikel.^[41]

Wie vorher schon erwähnt, besteht die elektrophoretische Abscheidung aus zwei Schritten. Der erste Schritt, die Wanderung der Partikel im elektrischen Feld, wurde schon ausführlich besprochen. Der zweite Schritt, die Abscheidung der Partikel auf der Elektrode, soll nun erläutert werden. Es gibt verschiedene Modelle, die sich mit der Beschreibung der elektrophoretischen Abscheidung beschäftigen. Im Gegensatz zur Wanderung der Partikel im elektrischen Feld ist der Mechanismus der Abscheidung noch nicht geklärt.

Seit den Jahren der Erforschung der elektrophoretischen Abscheidung wurden verschiedene Modelle zur Abscheidung vorgelegt, die zum Teil widerlegt werden konnten. Das erste Modell wurde von Hamaker und Verwey veröffentlicht. Sie schlussfolgerten, dass der Abscheidemechanismus analog der Sedimentbildung aufgrund der Gravitation funktionieren müsse.^[42] Sie beobachteten, dass eine stabile Suspension, wenn sie eine gewisse Zeit stehen gelassen wurde, ein Sediment ausbildete, das sehr fest war. Daraus folgerten sie, dass das elektrische Feld nichts mit der Abscheidung zu tun hat, sondern nur für die Wanderung der Partikel zur Abscheideelektrode erforderlich ist.^[42] Für die Abscheidung ist eine gewisse Stärke des elektrischen Feldes erforderlich, damit Partikel, die nahe einer abgeschiedenen Schicht sind, die abstoßende Kraft überwinden und ebenfalls abgeschieden werden können.^[42,43] Dieser Mechanismus alleine trifft allerdings nicht immer zu, da es möglich ist, Monolagen von z. B. Goldpartikeln, Platinpartikeln oder Latexpartikeln abzuscheiden.^[44–46] Ein weiteres Modell wurde im Jahre 1954 veröffentlicht. Die Bildung einer Schicht erfolgt dabei durch Ausflockung der Partikel, durch die Erhöhung der Ionenkonzentration direkt vor der Elektrode.^[47] Koelmans und Overbeek berechneten die kritische Ionenkonzentration und die Zeit, die benötigt wird, um die kritische Koagulationsgrenze zu erreichen, um eine Flockung hervorzurufen.^[47] Diese Theorie wurde allerdings von Brown und Salt im Jahre 1965 widerlegt. Sie zeigten, dass Abscheidungen auch in Abwesenheit eines Elektrolyten

2. Theoretische Grundlagen

möglich sind.^[48] Ein weiteres Modell beschäftigt sich mit dem Verlust der Partikelladung an der Elektrode.^[49] Dieses Modell ist allerdings auch nicht zutreffend, da Smolomentsey et al. zeigten, dass eine Umkehr der Polarität des elektrischen Feldes zu einer Ablösung der Partikel führt.^[50] Dies lässt den Schluss zu, dass die Partikel noch geladen sein müssen. Durch Elektrodenreaktionen kann die Koagulation der Partikel bei der EPD nicht erklärt werden, daher entwickelten Verwey und Overbeek eine Theorie, die auf dem Konzept der DLVO-Theorie basiert.^[51] Ein wichtiger Aspekt in ihren Berechnungen ist die Überlagerung der anziehenden und abstoßenden Kräfte aufgrund der diffusen Doppelschicht. Damit war es ihnen möglich, das zur Abscheidung benötigte elektrische Feld zu berechnen. Es wurde allerdings von Brown und Salt gezeigt, dass die berechneten und experimentell bestimmten elektrischen Felder nicht übereinstimmen, sie wichen deutlich voneinander ab.^[48]

Das nächste Modell, welches entwickelt wurde, basiert auf einer Deformation der Doppelschicht aufgrund des Mediums und des elektrischen Feldes.^[52] Es baut sich ein Ungleichgewicht der Doppelschicht um das Partikel auf, wobei die Doppelschicht in Bewegungsrichtung des Partikels dünner wird. Durch eine Herabsetzung der Dicke der Doppelschicht durch Ionenreaktionen um das Partikel kann es zu einer Koagulation bzw. Abscheidung kommen, wenn sich zwei Partikel mit einer dünnen Doppelschicht zu nahe kommen. Daran erkennt man, dass die anziehenden van-der-Waals-Kräfte dominant auf die Partikel wirken.^[52] Die so berechneten elektrischen Felder wichen erneut von den experimentell ermittelten ab. Dies wurde von Sarkar und Nicholson durch einen starken Potentialabfall über der Elektrode begründet.^[52] Wang und Wilson untersuchten die Aggregation von Partikeln in einem elektrischen Feld. Sie stellten fest, dass die Aggregation von Partikeln auf hydrodynamische Kräfte zurückzuführen ist.^[53,54] Zur gleichen Zeit, als Wang die Theorie der Aggregation durch hydrodynamische Kräfte veröffentlichte, veröffentlichte Trau die Theorie der Wechselwirkung zwischen Partikeln durch elektrophoretische Kräfte.^[55] Trotz dieser Vielzahl von Modellen ist es noch nicht gelungen, eine eindeutige Aussage über den Abscheidemechanismus zu treffen.

Am Anfang dieses Abschnitts wurde die Theorie von Hamaker eingeführt, der als erster eine Gleichung aufstellte, die die Abscheiderate $\frac{dm}{dt}$ auf eine Elektrodenfläche A beschreibt.^[43,56]

$$\frac{dm}{dt} \frac{1}{A} = a \mu E c(t, E) ; \quad \mu = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} f(\kappa a) \quad (2.7)$$

2. Theoretische Grundlagen

mit

a = Anteil der Partikel nahe der Elektrode ($0 < a < 1$) (dimensionslos)

μ = elektrophoretische Mobilität

E = elektrische Feldstärke

c = Konzentration des Feststoffs in der Suspension in g cm^{-3}

Gleichung 2.7 zeigt die Abhängigkeit der abgeschiedenen Masse von verschiedenen Faktoren. Nach Hamaker ist die abgeschiedene Masse in bestimmten Grenzen direkt proportional zu diesen Faktoren. Die Grenzen wurden in Versuchen ermittelt. Abweichungen in der Schichtdicke ergaben sich, wenn zu geringe elektrische Felder angelegt wurden, die Abscheidezeit oder die Konzentration des Feststoffs in der Suspension zu gering war.^[43] Weitere Versuche zeigten, dass Hamakers Gleichung die Abscheiderate als Funktion des Feststoffanteils nicht exakt darstellt.^[57] Im Jahre 1999 entwickelte Biesheuvel einen Korrekturfaktor, der die Veränderung der Feststoffkonzentration in der Suspension während der Abscheidung berücksichtigt.^[58]

$$m = a \mu E A c \frac{\phi_s}{\phi_c - \phi_s} t \quad (2.8)$$

mit

ϕ_c = Volumenkonzentration der abgeschiedenen Masse

ϕ_s = Volumenkonzentration der Partikel

Der Korrekturfaktor besteht aus der Volumenkonzentration der Partikel ϕ_s und der Volumenkonzentration der abgeschiedenen Masse ϕ_c . Die Gleichung 2.7 von Hamaker gilt wieder, wenn ϕ_s sehr viel kleiner als ϕ_c ist, da der Korrekturfaktor dann vernachlässigt werden kann.

Verschiedene experimentelle Untersuchungen zeigten aber keinen linearen Verlauf, wie es Hamaker postulierte, sondern einen s-förmigen Verlauf der abgeschiedenen Masse als Funktion der Abscheidezeit.^[59,60] Am Anfang der Abscheidung nimmt die abgeschiedene Masse langsam zu, weniger als von Hamaker postuliert, anschließend erhöht sich die abgeschiedene Masse erheblich, diese Erhöhung nimmt nach einer langen Abscheidezeit ab und geht in einen flachen linearen Verlauf mit geringer Zunahme über. Auf der Grundlage von Hamaker und Sarkar & Nicholson^[52]

2. Theoretische Grundlagen

entwickelte Ferrari ein mathematisches Modell, um den s-förmigen Verlauf der Abscheidung zu erklären.^[59] Der s-förmige Verlauf wurde mit der Änderung der Leitfähigkeit und der Partikelkonzentration erklärt. Das Modell gilt für Abscheidungen mit einer langen Laufzeit. In besonderen Fällen, z.B. für kurze Abscheidezeiten, gilt das Modell von Hamaker, bei langen Abscheidezeiten und konstantem Widerstand gilt das Modell von Sarkar & Nicholson.

Die elektrophoretische Abscheidung kann in verschiedenen Dispergiermedien durchgeführt werden. Organische Lösungsmittel werden sehr häufig verwendet, da sie gegenüber Wasser einen großen Vorteil bieten. Mit ihnen ist es möglich, Abscheidungen mit hohen Spannung durchzuführen. Eine Elektrolyse des Mediums ist damit vermeidbar.^[61] Außerdem werden organische Lösungsmittel aufgrund ihrer geringen Leitfähigkeit und ihrer chemischen Stabilität bevorzugt.^[5] Darum werden viele wissenschaftliche Untersuchungen bezüglich der EPD in organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Einen Überblick über verschiedene bei der EPD verwendete Lösungsmittel gibt Besra.^[5] Da manche Abscheidemodelle auf der DLVO-Theorie basieren, sollte darauf geachtet werden, dass die DLVO-Theorie nur für wässrige Medien gilt. Einige Nachteile haben organische Lösungsmittel im Gegensatz zum Wasser. Sie müssen speziell entsorgt werden, verursachen erhöhte Kosten, sind zum Teil toxisch und brennbar. Ein Vorteil der organischen Lösungsmittel ist allerdings, dass bei gleichen Abscheidebedingungen höhere Abscheideraten erzielt werden können.

2.4. Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen. Bei der Transfektion ist es wichtig, die extrazellulären Moleküle durch die Zellmembran der Zelle zu bringen. Anschließend erfolgt ein Transport der DNA im Zytoplasma, das dann mit dem Einbringen der DNA im Zellkern endet. Dabei wird zwischen der transienten und der stabilen Transfektion unterschieden. Bei der transienten Transfektion wird das Plasmid nur für eine bestimmte Zeit in die Wirtszelle eingebracht, während bei der stabilen Transfektion das Plasmid dauerhaft in das Genom der Zelle eingebaut wird. Um die Zellmembran zu überwinden, braucht die DNA einen geeigneten Vektor, da sie sonst durch ihre negative Ladung von den Zellen nicht aufgenommen werden kann. Versuche mit direkt eingebrachter DNA in Organe zeigten, dass die Transfektion dabei nur sehr gering

2. Theoretische Grundlagen

war.^[62–64] Um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, muss der Transport der DNA in den Zellkern gewährleistet sein. Des Weiteren ist sie abhängig von der Anzahl der transfizierten Zellen, von der Menge des genetischen Materials, welches erfolgreich transfiziert wurde, und von der Mortalität der Zellen, die die Transfektion überleben. Es existieren verschiedene Transfektionsmethoden, die je nach Zelltyp ausgewählt werden können. Es gibt chemische, physikalische und biologische Verfahren, die es ermöglichen, Fremd-DNA oder -RNA in Zellen einzubringen. Das Einbringen von Fremd-DNA mit Hilfe eines Virus ist eine weitere Möglichkeit. Dieses Verfahren wird als Transduktion bezeichnet.^[65–67] Als virale Vektoren dienen Retroviren^[68,69], Adenoviren^[70–72] und adenoassoziierte Viren^[73,74]. Als nicht-virale Vektoren stehen Liposome^[75,76], nichtliposomale Lipide^[77,78], Polykationen^[79–82] und Nanopartikel^[83–88] zur Verfügung. Die virale Infektion ist die älteste Methode für den Gentransfer, sie wurde im Jahr 1952 von Zinder und Lederberg postuliert.^[89] Dabei wird die Fähigkeit von Viren, Zellen zu infizieren und DNA in den Zellkern einzuschleusen, ausgenutzt. Für die Transfektion muss ein Teil des Virusgenoms durch das transfizierende Gen ausgetauscht werden. Durch diese Methode ist es möglich, eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, allerdings beinhaltet diese Methode auch Nachteile. Es besteht das Risiko der Rekombination, Karzinogenität und Immunogenität.^[90,91] Wegen dieser Risiken geht der Trend der Forschung in Richtung der nichtviralen Vektoren. Die physikalischen Verfahren sind die Mikroinjektion, die Elektroporation, die Genkanone und die Magnetofektion.

Mikroinjektion Nackte bzw. freie DNA als Plasmid, einzelsträngige DNA oder doppelsträngige DNA wird in die Zelle mikroinjiziert. Dies erfolgt mit einer Mikrokapillare, die die DNA direkt ins Zytoplasma injiziert. Bei diesem Verfahren muss jede einzelne Zelle transfiziert werden, was einen sehr großen Nachteil darstellt, wenn die Zellzahl hoch ist. Allerdings besitzt dieses Verfahren eine Transfektionseffizienz von nahezu 100 %.^[92,93]

Elektroporation Bei der Elektroporation wird die Zellmembran permeabel für DNA gemacht, indem die Zellen einem elektrischen Feld mit einer hohen Spannung ausgesetzt werden.^[94] Diese Methode wird seit dem Jahr 1982 angewendet. Sie wird verwendet, um DNA in verschiedene Zelltypen einzubringen.^[95] Durch die Lipiddoppelschicht sind Zellen isoliert, d.h. es kann kein Strom durch die Zelle fließen. Um einen Stromfluss zu ermöglichen müssen Poren in der Membran entstehen. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes kommt es zu einem Polarisieren der Membran. Nach dem Erreichen einer

2. Theoretische Grundlagen

kritischen Spannung kommt es zum Ausbilden von hydrophoben Poren, diese wandeln sich ab einer bestimmten Größe in hydrophile Poren um. Die Lebensdauer dieser Poren ist beschränkt, sie liegt bei wenigen Sekunden bis einigen Minuten. Dies ist abhängig von der Änderung der Membranspannung, bedingt durch den Ladungsausgleich durch die Poren sowie von der Reorganisation des Systems.^[96–98] Es gibt verschiedene Parameter der Elektroporation, die die Effizienz der Genexpression beeinflussen. Diese sind die Spannung, die Pulsdauer und die Pulshäufigkeit. Für jeden Zelltyp müssen diese Parameter für eine optimale Genexpression angepasst werden.^[99,100]

Genkanone Die Genkanone, auch *gene gun* genannt, wurde ursprünglich für die Einbringung von Genmaterial in Pflanzen entwickelt.^[101,102] Diese Methode wurde im Jahre 1987 erfunden^[103] und ab 1990 wurde die Methode erstmalig an Tieren angewendet.^[104] Für das Einbringen der DNA werden Gold-Nanopartikel mit DNA des zu transfizierenden Gens funktionalisiert und mittels eines Helium-Puls-Gerätes in die Zelle geschossen.^[105] Die Partikel werden durch das Auftreffen auf die Zelle verlangsamt, wobei es dann nach dem Eindringen in die Zelle zum Ablösen der DNA vom Partikel kommt. Ein wichtiger Punkt ist die Größe der Partikel. Je kleiner die Partikel sind, desto höher ist die Effektivität.^[106] Die Transfektionseffizienz bei dieser Methode ist ebenfalls abhängig von der Art des zu transfizierenden Gewebes. Für Muskelzellen beträgt die Effizienz 1-5 %, wobei Epitelzellen der Haut eine Effizienz von 10-20 % zeigen.^[104,107,108] Was bei dieser Methode allerdings berücksichtigt werden muss, ist die hohe Mortalität der Zellen.

Magnetofektion Bei der Magnetofektion werden superparamagnetische Nanopartikel, die mit DNA funktionalisiert wurden, in Zellen eingebracht. Dieses Einschleusen gelingt mit Hilfe eines Magnetfeldes, das die Partikel in die Zellen leitet.^[109,110] Die Aufnahme der Partikel erfolgt mittels Endozytose.^[111] Smith *et al.* zeigten allerdings auch, dass das Magnetfeld einen Einfluss auf die Genexpression der Zellen hat.^[112]

Chemische Verfahren benutzen andere Methoden, um die Zellmembran zu überwinden. Es gibt zwei Möglichkeiten für DNA die Zellmembran zu überwinden, entweder sie komplexiert mit einer Substanz oder sie geht eine Verbindung mit dieser ein. Es kann zwischen folgenden chemischen Transfektionstechniken unterschieden werden.

2. Theoretische Grundlagen

Calcium-Phosphat-Fällung Bei dieser Methode wird ein DNA-Calciumphosphat-Komplex auf die Zellmembran ausgefällt. Diesen Komplex erhält man, indem Calciumchlorid in Gegenwart von DNA mit Natriumphosphat zu Calciumphosphat gefällt wird. Die Kristalle werden von der Zelle durch Endozytose aufgenommen. Diese Prozedur wurde erstmals von Graham und van der Eb im Jahre 1973 beschrieben.^[113] Diese Art der Transfektion ist von einer Vielzahl von Parametern abhängig, die von Zellart zu Zellart wiederum variieren. Die Parameter setzen sich aus der Menge der Plasmid-DNA, Reinheit der Plasmid-DNA, Konzentration der Carrier-DNA, Größe der Carrier-DNA, Salzkonzentration und pH-Wert der Lösung, Inkubationsdauer und Präselektionsdauer zusammen.^[114] Die Transfektion sollte bei dieser Methode in einem serum- oder antibiotikafreien Medium durchgeführt werden.

Lipofektion Bei der Lipofektion überwindet die DNA mit Hilfe von Liposomen oder Vesikeln die Zellmembran. Die Liposomen oder Vesikel fusionieren sehr leicht mit der Zellmembran. Es gibt zwei verschiedene Methoden, die unterschieden werden. Das ältere Verfahren ist der Einschluss der DNA in das Lumen unilamellarer Phospholipidvesikel, das zweite Verfahren ist die Komplexierung der DNA an der Oberfläche von kationischen Lipidvesikeln.^[115,116] Die Größe der Vesikel ist verglichen mit der Größe von Liposomen deutlich kleiner. Vesikel bestehen aus Lipidmonolayern, während Liposomen aus Bilayern bestehen. Die Aufnahme der DNA in die Zelle erfolgt durch Endozytose. Die DNA gelangt in das Zytoplasma, wenn das Endosom zerfällt.

Kationische Polymere Im Jahre 1968 wurde das erste Mal die Transfektion von Diethylaminoethyldextran (DEAE-Dextran) von McCutchan und Pagano publiziert.^[117] Diese Methode erzielt Transfektionseffizienzen von bis zu 30 % mit einer durchgängig transienten Transfektion.^[118] Die DNA wird durch Komplexierung an das positive Polymer gebunden, dieses wird wiederum durch Endozytose von den Zellen aufgenommen. DEAE-Dextran ist gut verträglich für Zellen. Ein weiteres häufig verwendetes Polymer ist Polyethylenimin (PEI). Dieses Polykation ist in der Lage, DNA zu komplexieren. Die erhaltenen Teilchen haben eine Größe < 200 nm.^[119–121] Die Transfektionseffizienz ist abhängig von der Fähigkeit der Polykationen, wie gut sie die DNA in nanopartikularer Form komplexieren können.^[122,123] Des Weiteren ist die Größe des Teilchens entscheidend für die Transfektionseffizienz. Je kleiner das Teilchen, desto höher die Transfektionseffizienz.^[124] PEI ist das Polykation, das

2. Theoretische Grundlagen

die höchste Transfektionseffizienz aller Polykationen aufweist. Der Nachteil ist allerdings seine Zytotoxizität abhängig von seinem Molekulargewicht^[125–130]. Die positive Ladung, die auch nach der Komplexierung mit DNA erhalten bleibt, ermöglicht ein Durchdringen der Zellmembran. Nach der Aufnahme in die Zelle durch Endozytose werden die Teilchen nicht vollständig im Endosom abgebaut, so dass die DNA bis zum Zellkern gelangen kann.^[131]

Nanopartikel Zellen ist es möglich, Nanopartikel aufzunehmen. Deshalb eignen sie sich sehr gut als Transporter von DNA in die Zelle. Für die Transfektion werden anorganische Nanopartikel verwendet, wie z.B. Calciumphosphat, Gold, Magnetit oder Kieselsäure.^[132–136] Calciumphosphat-Nanopartikel eignen sich hervorragend für diese Art der Transfektion, da die Partikel beim Abbau in der Zelle keine toxischen Substanzen bilden. Da Zellen Ionenpumpen in der Membran besitzen, kann die Zelle die Erhöhung der Calciumkonzentration ausgleichen, bevor die Calciumkonzentration in der Zelle toxisch wird.^[137,138] Auf die Verwendung von toxischen Nanopartikeln wird bei dieser Art der Transfektion verzichtet.

Bei den biologischen Verfahren werden existierende biologische Transportmechanismen ausgenutzt, um die DNA in die Zelle zu schleusen. Darunter fallen die Transferinfektion und die Antikörper vermittelte Transfektion.^[139,140]

2.5. Alginat

Alginsäure wird von Braunalgen gebildet. Sie bildet das strukturgebende Element der Zellwände in der Alge. Die Salze der Alginsäure werden Alginat genannt. Die Algen, die für die Herstellung von Alginat geeignet sind, sind *Laminaria*, *Ecklonia*, *Macrocystis*, *Lessonia*, *Ascophylum* und *Durvillea*. Das Alginat wird aus den Algen extrahiert und mittels Filter- und Ausfällungsschritten gereinigt. Das erhaltene Alginat ist ein Polysaccharid, welches aus den Uronsäuren α -L-Guluronsäure (G) und β -D-Mannuronsäure (M) besteht (Abbildung 2.8). Diese sind 1,4-glycosidisch miteinander verbunden.^[141]

Es werden homopolymere Bereiche gebildet, in denen die Uronsäuren als Blöcke (GG- oder MM-Blöcke) vorliegen. Diese Blöcke liegen in einer Art Faltstruktur vor, welche eine wichtige Rolle bei der Gelierung spielt. Zur Vernetzung kommt es,

2. Theoretische Grundlagen

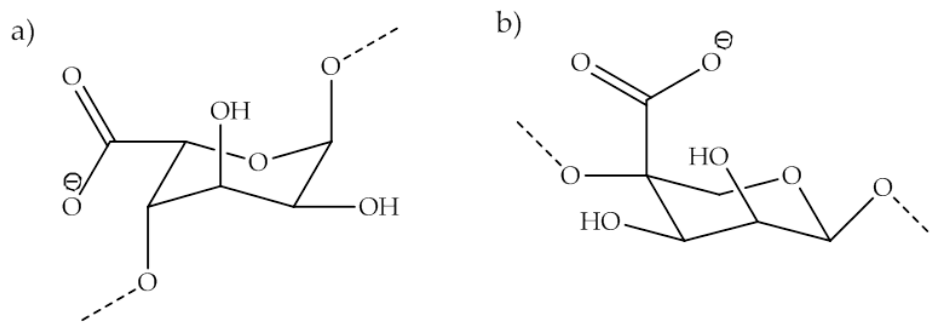


Abbildung 2.8.: Chemische Struktur der Alginat Monomere a) (1-4)- α -L-Guluronat und b) (1-4)- β -D-Mannuronat.

wenn sich Ionen in die Zickzackstruktur der GG-Blöcke einlagern. Dabei kommt es zur Bildung von dreidimensionalen Strukturen, da sich die Zickzackstrukturen übereinander lagern.^[142] Die Einlagerung von Ionen in dieser Struktur wird auch als Eierschachtel-Struktur oder *Eggbox*-Struktur bezeichnet, da die Ionen in dieser Struktur wie ein Ei in der Schachtel liegen. Die physikochemischen Eigenschaften der Vernetzung sind über den Anteil der jeweiligen Monomere einstellbar. Wenn der M-Anteil hoch ist, erhält man elastische Hydrogele, die Erhöhung der G-Anteile führt zu festeren Hydrogelen. Einen weiteren Einfluss auf die Eigenschaften der Gele hat die Wahl der Ionen: Ba^{2+} vernetzt (Abbildung 2.9) das Alginat stärker als Ca^{2+} . Alginat finden in vielen Bereichen Anwendung. In der Biomedizin sind sie von großer Bedeutung, da sie ultrarein, steril, biokompatibel und implantierbar sind. Sie zeichnen sich auch dadurch aus, dass sie biologisch inert sind.^[8]

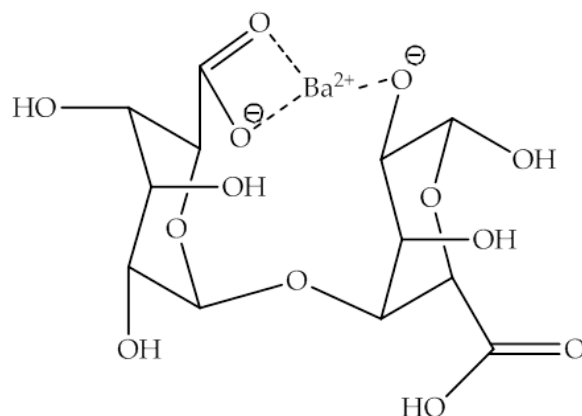


Abbildung 2.9.: Vernetzung von zwei (1-4)- α -L-Guluronat-Einheiten mit Barium.

3. Methoden

In diesem Teil der Arbeit sollen kurz die analytischen Methoden, die zur Charakterisierung der Nanopartikel, der elektrophoretisch abgeschiedenen Schichten und der biologischen Systeme verwendet wurden sowie ihre theoretischen Grundlagen vorgestellt werden.

3.1. Analytische Methoden

3.1.1. Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential

3.1.1.1. Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist auch unter dem Namen Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bekannt. Bei dieser Methode wird der hydrodynamische Radius von Partikeln oder Molekülen in Dispersion bestimmt. Das Prinzip basiert auf der Rayleigh-Streuung. Dabei wird das Licht an kleinen Partikeln oder Molekülen in alle Richtungen gestreut. Das Streulicht von verschiedenen Streuzentren interferiert daraufhin miteinander. In der DLS wird ein monochromatisches Laserlicht verwendet, dies führt zu einer Fluktuation in der Streuintensität, verursacht durch die Brown'sche Molekularbewegung durch die sich die Abstände der Streuzentren ständig ändern. Um Informationen über die Geschwindigkeit der Partikelbewegung in Lösung zu erhalten, müssen die Fluktuationen zeitabhängig beobachtet werden. Mittels einer Autokorrelationsfunktion werden die dynamischen Kenngrößen der Partikel ermittelt. Im Fall von monodispersen Partikeln erhält man eine Exponentialfunktion. Deren Verlauf weicht bei polydispersen Systemen ab. Im Fall von monodispersen Kugeln hängt die Korrelationsfunktion vom Translationsdiffusionskoeffizienten ab. Durch die Ermittlung des Diffusionskoeffizienten lässt sich der hydrodynamische Radius mit der Stokes-Einstein-Beziehung berechnen.

3. Methoden

$$r_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (3.1)$$

r_H = hydrodynamischer Radius

k = Boltzmann-Konstante

T = Temperatur

η = Viskosität des Lösungsmittels

D = Diffusionskoeffizient

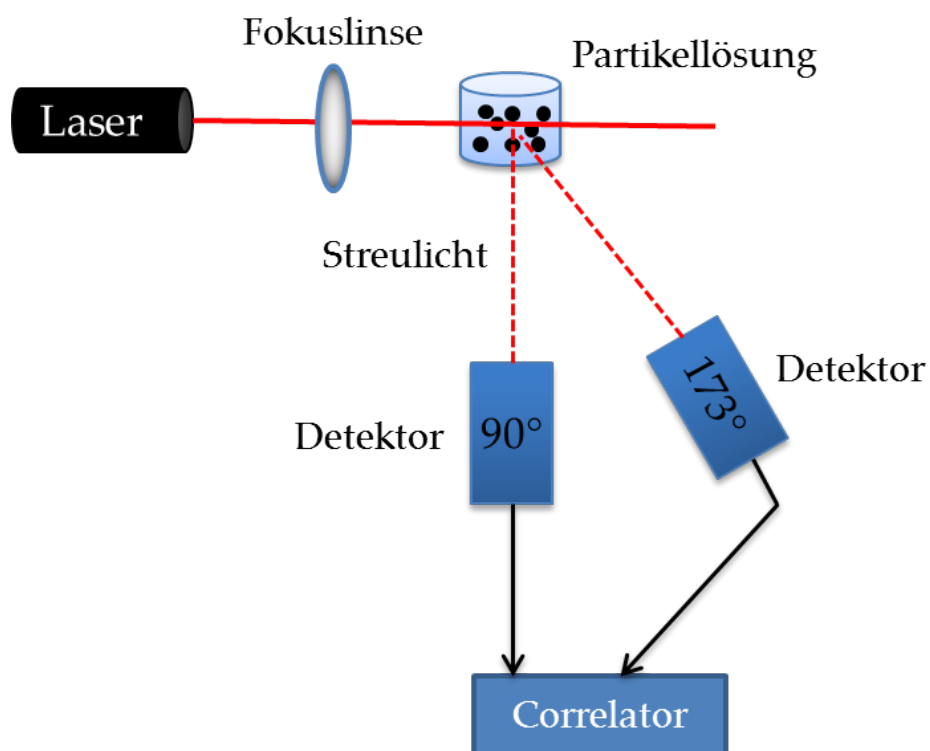


Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem Malvern Zetasizer NanoZS.

Die Auswertung der Messung erfolgt nach der Kumulantenmethode. Durch diese erhält man Werte für die Teilchengröße sowie die Breite der Verteilung. Aus dem Kumulanten-Fit lässt sich der Polydispersitätsindex (PDI) der Probe berechnen. Dieser Wert erhält Informationen über die Breite der Größenverteilung der Partikel. Ein PDI von 0 entspricht einer streng monodispersen Größenverteilung, dieser Wert ist in der Praxis kaum zu erreichen. Von einer monodispersen Verteilung spricht man bis zu einem PDI von 0,3, ab einem Wert von 0,5 ist die Dispersion polydispers.

3. Methoden

Die Messungen zur Bestimmung der Partikelgröße wurden mit einem Malvern Zetasizer NanoZS (Laserwellenlänge 633 nm) durchgeführt. Dieses Gerät arbeitet mit *Non-Invasive Backscatter optics*(NIBS). Bei dieser Methode wird das Streulicht erhöht, ohne die Signalqualität zu verringern. Dadurch wird die Empfindlichkeit für die Messung der Größe und des Molekulargewichts von Molekülen, die kleiner 1000 Da sind, erhöht. Es ermöglicht zudem eine Messung bei extrem hohen Konzentrationen. Die Verwendung von Rückstreulicht in einem Winkel von 173° anstatt der Erfassung von Streulicht in einem Winkel von 90° erhöht die Messempfindlichkeit und gleichzeitig werden Störungen durch Mehrfachstreuung minimiert. NIBS ist eine berührungslose Technik, dadurch entfällt eine Reinigung der Messzelle und des Detektors. Wässrige Proben werden in einer Polystyrol-Kapillarzelle, Proben in organischen Lösungsmitteln in einer Quarzglas-Küvette vermessen. Der schematische Aufbau des Strahlengangs im Zetasizer ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Durch eine Fokuslinse lässt sich der Laserfokus innerhalb der Messzelle verschieben. Für kleine Partikel oder Proben mit geringer Konzentration wird der Fokus in der Mitte der Probe anvisiert, um die Streuung der Probe zu erhöhen. Bei großen Partikeln oder Proben mit hohen Konzentrationen tritt mehr Streulicht auf, deshalb wird die Messung in der Nähe des Küvettenrandes durchgeführt, um so die Wahrscheinlichkeit der Vielfachstreuung zu verringern (Abbildung 3.2).

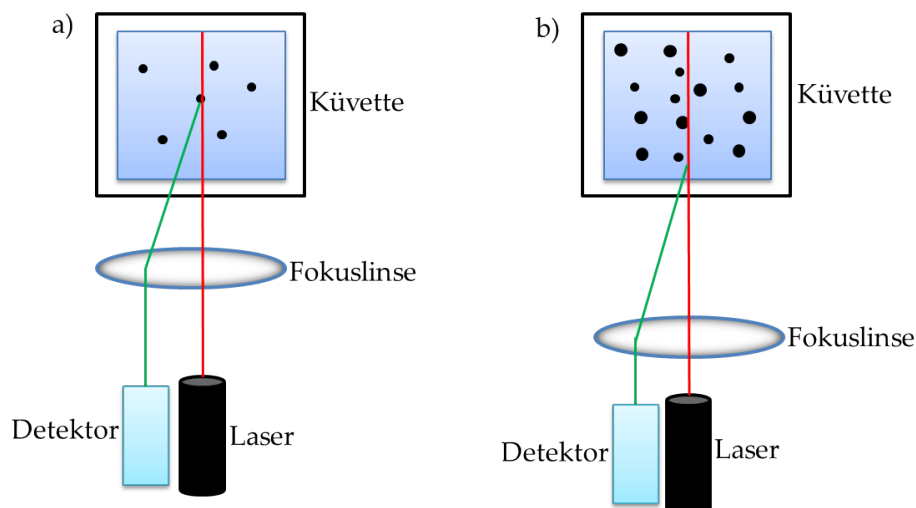


Abbildung 3.2.: Schematische Darstellung einer Messung mit NIBS. Hierbei können aufgrund des variablen Laserfokus sowohl verdünnte a) als auch konzentrierte b) Dispersionen gemessen werden.

3.1.1.2. Zetapotential

Das Zetapotential (ζ) wird auch Coulomb-Potential genannt. Es ist das elektrische Potential an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in einer Suspension. Das Zetapotential kann nicht direkt gemessen werden, sondern wird über andere messbare Größen berechnet. Es gibt Auskunft über elektrochemische Eigenschaften eines Partikels in einer Flüssigkeit. Durch die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität der Partikel und anschließender Berechnung mit der Henry-Gleichung lässt sich das Zetapotential bestimmen. Die elektrophoretische Mobilität ist über ein elektrophoretisches Experiment bestimmbar. Dabei wandern geladene Partikel in einem angelegten Feld entsprechend ihrer Ladung zur Elektrode der Gegenladung. Die Geschwindigkeit der Teilchen ist abhängig von folgenden Faktoren:

- Stärke des elektrischen Feldes oder des Spannungsgradienten
- Dielektrizitätskonstante des Medium
- Viskosität des Mediums
- Zetapotential

Die Geschwindigkeit der Partikel in einem elektrischen Feld wird als ihre elektrophoretische Mobilität bezeichnet.

$$U_E = \frac{v}{E} \quad (3.2)$$

U_E = Elektrophoretische Mobilität

v = Wanderungsgeschwindigkeit

E = Elektrische Feldstärke

Mit Hilfe der Henry-Gleichung lässt sich aus der elektrophoretischen Mobilität das Zetapotential berechnen.

$$\zeta = \frac{3U_E\eta}{2\epsilon f(\kappa a)} \quad (3.3)$$

ζ = Zetapotential

U_E = Elektrophoretische Mobilität

3. Methoden

η = Viskosität

ϵ = Dielektrizitätskonstante

$f(\kappa\alpha)$ = Henry-Funktion in Abhängigkeit von der Debeyelänge κ und des Partikelradius α

Es existieren zwei Näherungen zur Berechnung des Zetapotentials. In wässrigen Medien mit geringen Elektrolytkonzentrationen wird eine Näherung nach Smoluchowski angenommen, der Wert von 1,5 wird für die Henry-Funktion eingesetzt. Für kleine Partikel in Medien mit kleiner Dielektrizitätskonstante wird ein Wert von 1,0 für $f(\kappa\alpha)$ eingesetzt. Dies ist die sogenannte Hückel-Approximation. In nicht wässrigen Medien wird generell die Hückel-Approximation verwendet. Die Bestimmungen des Zetapotentials wurden mit dem Malvern Zetasizer Nano ZS durchgeführt.

3.1.2. Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersive Röntgenspektroskopie

3.1.2.1. Rasterelektronenmikroskopie

Mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) ist es möglich, Objekte im Nanometer Bereich darzustellen. Dabei wird eine Oberfläche mit einem gebündelten Elektronenstrahl abgerastert. Mit einem Lichtmikroskop, welches durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes beschränkt ist und die Auflösung des Mikroskops, ist dies nicht möglich. Elektronenstrahlen, die im REM verwendet werden, kann eine Wellenzahl λ zugeordnet werden, dies ist aufgrund der Doppelnatur von Wellen und Strahlen möglich. Nach de Broglie lässt sich die Wellenlänge wie folgt berechnen:

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (3.4)$$

m = Masse eines Elektrons

v = Geschwindigkeit der Elektronen

h = Planksches Wirkungsquantum

3. Methoden

Werden Elektronen durch ein bestimmtes Potential U beschleunigt, so ergibt sich für die Elektronen eine Energie von:

$$Ue = \frac{mv^2}{2} \quad (3.5)$$

mit

e = elektrische Elementarladung ($e = 1,60022 \cdot 10^{-19} \text{ C}$)

Hierbei ist eine Abhängigkeit zwischen der Wellenlänge und der Beschleunigungsspannung ersichtlich. Wenn die Geschwindigkeit der Elektronen v sich der Lichtgeschwindigkeit c annähert und m durch die Ruhemasse m_0 des Elektrons ersetzt wird, ist es möglich mit dem Korrekturfaktor $(1 + Ue/2 m_0 c^2)^{-1/2}$ die Wellenlänge zu berechnen.

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2mUe}} \text{ oder in } \text{\AA} : \lambda = \sqrt{\frac{150}{U(\text{Volt})}} \quad (3.6)$$

Durch Beschleunigung der Elektronen ist es möglich, das laterale Auflösungsvermögen zu erhöhen und die Auflösungsbeschränkung des Lichtmikroskops zu überwinden. Das Rasterelektronenmikroskop arbeitet mit Beschleunigungsspannungen in der Größenordnung von 5-30 kV. Um das Auflösungsverhältnis zu erhöhen, muss die Spannung erhöht werden, was wiederum zu einem Verlust der Tiefenschärfe führt. Alle Proben werden im Hochvakuum untersucht, um Wechselwirkungen des Elektronenstrahls mit Molekülen aus der Luft zu vermeiden. In einer Glühkathode werden Elektronen erzeugt und durch eine Anode beschleunigt. Der so erzeugte Primärelektronenstrahl wird durch einen Wehnelt-Zylinder fokussiert, anschließend passiert der Strahl elektromagnetische Spulen, diese bündeln den Strahl und er trifft fokussiert auf das zu untersuchende Objekt. Die Probe wird Punkt für Punkt abgetastet, dabei werden Elektronen durch den Elektronenstrahl aus der Probe herausgeschlagen. Diese Elektronen haben eine niedrigere Energie als die eingestrahlenen Elektronen (Primärelektronen) und werden als Sekundärelektronen bezeichnet. Die Intensität der Sekundärstrahlung ist vom Neigungswinkel der Objektoberfläche abhängig. Die Sekundärelektronen werden von einem seitlich angebrachten Detektor aufgefangen, dadurch entsteht die Plastizität der Objekte, denn durch die schräge Anordnung erscheinen dem Detektor zugewandte Details heller als abgewand-

3. Methoden

te. Das Bild der Probe wird durch die Detektion der Primär- und Sekundärelektronen berechnet. Es können nur leitende Oberflächen dargestellt werden, nichtleitende Proben können sich aufladen. Dadurch kann der Elektronenstrahl abgelenkt werden, was dazu führt, dass das Bild weiß dargestellt wird. Um dies zu vermeiden, werden nicht leitende Proben mit einer leitenden Schicht (z.B. Ag und Pd) besputtert. Die aufgedampfte, leitende Schicht darf nicht zu dick sein, da sonst feine Strukturen der Probe abgedeckt werden. Die in dieser Arbeit gezeigten REM-Bilder wurden mit einem FEI Quanta FEG 400 angefertigt.

3.1.2.2. Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Mit einem Rasterelektronenmikroskop ist es nur möglich, die Oberfläche der Probe abzubilden. Um etwas über das Material der Probe zu erfahren, benutzt man die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX; *energy dispersive X-ray spectroscopy*). Dabei lässt sich die elementare Zusammensetzung einer Probe durch emittierte Röntgenstrahlen bestimmen. Die Atome der Probe werden mit einem Elektronenstrahl angeregt, durch die Anregung wird anschließend ein Elektron aus der inneren Schale des Atoms herausgeschlagen. Die entstandene Lücke wird von einem Elektron aus einer energetisch höheren Schale aufgefüllt, dabei emittiert dieses Elektron eine charakteristische Röntgenstrahlung. Durch diese für jedes Element charakteristische Röntgenstrahlung kann ein Röntgenspektrum der Probe aufgenommen werden. Anschließend können die Peaks den Elementen, die in der Probe vorhanden sind, zugeordnet werden. Die EDX-Spektren in dieser Arbeit wurden mit dem EDAX EDS-Analysesystem Genesis 4000 aufgenommen.

3.1.3. Röntgenpulverdiffraktometrie

Die Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD; *x-ray diffraction*) ist eine Methode, um geordnete Strukturen wie Kristalle oder Quasikristalle zu analysieren. Dabei wird die Probe mit monochromatischem Röntgenlicht bestrahlt und die Streustrahlung detektiert. Die Wellenlänge liegt in der Größenordnung von 1 pm bis 10 nm, was dem Abstand der Atome in Kristallgittern entspricht. Daher wird die Röntgenstrahlung an der Elektronenhülle der Atome gebeugt und die gebeugten Wellen interferieren miteinander. Ob es zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz kommt, hängt vom Abstand der Atome zueinander ab. Der Abstand der Atome zueinander ist

3. Methoden

für die unterschiedlichen Gangunterschiede der gebeugten Wellen verantwortlich. Konstruktive Interferenz ist nur zu beobachten, wenn der Gangunterschied zwischen den Strahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist. Dieser Gangunterschied kann aus dem Einfallswinkel θ und dem Netzebenenabstand d_{hkl} mit Hilfe der Bragg'schen Beziehung berechnet werden:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta \quad (3.7)$$

n = Beugungsordnung

λ = Wellenlänge der Röntgenstrahlen

d_{hkl} = Abstand der Netzebenen

θ = Bragg-oder Glanzwinkel

Diese Gleichung ist nur für einen bestimmten Winkel erfüllt, den Bragg- oder Glanzwinkel. Die Messungen werden in einem Winkel von 2θ durchgeführt, dabei werden die gebeugten Strahlen über einen beweglichen Detektor aufgenommen. Dieser kann ein Proportional-, Szintillations- oder Geiger-Müller-Zähler sein, der mit einer Zähl Elektronik verbunden ist. Bei nicht phasenreinen Pulvern können mehrere Beugungsmuster verschiedener kristalliner Anteile überlagert sein. Die einzelnen kristallinen Phasen können durch einen Vergleich mit der ICDD-(*International Centre for Diffraction Data*) Datenbank identifiziert werden. Von Bedeutung sind dabei das Beugungsmuster und die relativen Intensitäten der Signale. Der Grad der Kristallinität ist über die Röntgenbeugung bestimmbar. Sehr schmale Reflexe sprechen für eine hochkristalline Probe, wobei bei amorphen Proben keine Reflexe durch die fehlende Fernordnung zu erkennen sind. Bei nanokristallinen Proben sind die Reflexe trotz hoher Kristallinität aufgrund der begrenzten Dimensionen der Kristalle verbreitert. Die Pulverdiffraktogramme wurden mit einem D 8 Advance Diffraktometer der Firma Bruker aufgenommen. Zur Aufnahme wurde Kupfer-K α -Strahlung mit einer Wellenlänge von 1,54060 Å verwendet.

3.1.3.1. Rietveld-Methode

Die Rietveld-Methode ist eine Verfeinerungstechnik mit der kristalline Materialien charakterisiert werden können. Die Röntgenbeugung von Pulverproben erzeugt ein bestimmtes Muster von Reflexen. Die Höhe, Breite und Position der Reflexe

3. Methoden

gibt Aufschluss über viele Aspekte der zu untersuchenden Struktur. Die Rietveld-verfeinerung verwendet das Verfahren der mathematischen Methode der kleinsten Quadrate. Diese Verfeinerungsschritte werden so oft wiederholt, bis zwischen dem berechneten und dem gefundenen XRD-Diffraktogramm keine Unterschiede mehr bestehen. In der Praxis ist dies allerdings kaum erreichbar. Durch diese Methode können verschiedene Phasen in einer Pulverprobe charakterisiert und die Anteile der jeweiligen Phase prozentual berechnet werden.

3.1.4. UV/Vis-Spektroskopie

Bei der UV/Vis-Spektroskopie werden Elektronen mit ultravioletter und sichtbarem Licht angeregt. Der sichtbare Spektralbereich reicht von 400 bis 800 nm, der kurzwellige UV-Bereich geht bis zu einer Wellenlänge von 200 nm. Die ausgesandte elektromagnetische Strahlung wird durch einen Filter geleitet, der nur eine Strahlung einer bestimmten Wellenlänge durchlässt und diese Strahlung wird durch die zu vermessende Probe in der Messzelle geschickt. Der Teil der Strahlung, der von der Probe nicht absorbiert wird, wird von einem Detektor aufgefangen. Die Abschwächung der Intensität einer Strahlung bei Durchgang durch ein absorbierendes Medium wird durch das Lambert-Beersche-Gesetz beschrieben. Es ist abhängig von der Konzentration der absorbierenden Probe und der Schichtdicke. Es gilt:

$$E_{\lambda} = \lg \frac{I_0}{I_1} = \epsilon_{\lambda} c d \quad (3.8)$$

mit

E_{λ} = Extinktion

I_0 = Intensität des einfallenden Lichtes

I_1 = Intensität des transmittierenden Lichtes

c = Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz

ϵ_{λ} = dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

d = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers

Absorptionsmessungen können sowohl zur qualitativen als auch zur quantitativen Analyse verwendet werden. Für reine Substanzen ist die Zuordnung einer Struktur durch Vergleich mit katalogisierten Spektren durchführbar. Dabei ist die Lage des

Maximums oder der Maxima für die qualitative Analyse sowie die Form und Intensität der Absorptionsbanden von Bedeutung, da diese für die absorbierende Substanz charakteristisch ist. Quantitative Analysen werden hauptsächlich mit Hilfe von Kalibrierungsgeraden durchgeführt. Mit der Kalibrierungsgeraden ist es möglich, die Konzentration der Substanz mit Hilfe der Extinktion zu bestimmen. Die in dieser Arbeit enthaltenen UV/Vis-Spektren wurden mit einem Varian Cary WinUV Spektrophotometer mit Quarzküvetten Schichtdicke 1 cm erstellt.

3.1.5. Dynamische Differenzkalorimetrie

Die Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC; *differential scanning calorimetry*) ist eine Methode der thermischen Analyse. Dabei werden abgegebene oder aufgenommene Wärmemengen einer Probe bei isothermer Arbeitsweise, Aufheizung oder Abkühlung gemessen. Die DSC ist mit einem homogen aufheizbaren bzw. abkühlbaren Ofenraum ausgestattet. In diesem Ofenraum befinden sich zwei Probenhalter die mit hochempfindlichen Temperatursensoren verbunden sind. Auf einen Probenhalter wird ein leerer Referenztiegel gelegt, der zweite wird mit der zu untersuchenden Probe (5 - 40 mg) bestückt. Um oxidative Reaktionen zu vermeiden, ist es möglich, den Ofen permanent mit Schutzgas zu spülen. Es werden Wärmestromdifferenzen gemessen, welche als Funktion über die Zeit aufgezeichnet werden. Die Temperatursensoren nehmen die Differenz der Wärmeaufnahme bzw. -abgabe des Probenmaterials auf. Die zeitabhängigen Temperaturgradienten werden als exotherme oder endotherme Kurven dargestellt. Die Energieabgabe eines Materials nach der Zuführung von Wärme wird durch einen exothermen Effekt beschrieben. Wird die Wärme von der Probe aufgenommen, ist ein endothermer Effekt zu beobachten. Jeder zu untersuchende Stoff besitzt unterschiedliche physikalische und/oder chemische Eigenschaften. Daher weisen sie charakteristische Enthalpiereaktionen auf. Mit der DSC können folgende Parameter bestimmt werden:

- Schmelz- und Glasübergangstemperaturen
- Kristallisationsgrad
- kinetische Betrachtung chemischer Reaktionen
- spezifische Wärmekapazität
- Phasenübergänge

- Zersetzungspunkt
- Kunststoffbestimmung
- Reinheit von Substanzen

Die in dieser Arbeit gezeigten DSC Kurven wurden mit einem NETZSCH DSC 204 aufgenommen.

3.1.6. Thermogravimetrische Analyse

Bei der Thermogravimetrie (TG) werden Massenänderungen einer Probe in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Die Massenänderungen treten durch Verdampfung, Zersetzung, chemische Reaktion, magnetische oder elektrische Umwandlungen auf. Der Ofen kann auf Temperaturen bis zu 1100 °C erhitzt werden, dabei kann die Heizrate individuell gewählt werden. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Wahl des Spülgases. Es können inerte (Argon oder Stickstoff) oder oxidierende Spülgase (Sauerstoff und Luft) gewählt werden. Vor der Messung werden die Proben in einem kleinen Tiegel aus temperaturstabilen und inertem Material eingewogen (z.B. Platin oder Aluminiumoxid). Die Probe wird auf einem Probenhalter angebracht, der an eine Mikrowaage gekoppelt ist. Jede Massenänderung während der Heizphase wird damit registriert. Die Massenänderung kann absolut in mg oder relativ in % bezogen auf die Ausgangsmasse über die Temperatur aufgetragen werden. Der Massenverlust tritt in Stufen bei bestimmten Temperaturen auf, diese Stufen lassen Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des Stoffes zu. Die Messung, die in dieser Arbeit gezeigt wird, wurde mit einem NETZSCH STA 449 F3 Jupiter durchgeführt.

3.1.7. Kritisch-Punkt-Trocknung

Die Kritisch-Punkt-Trocknung (CPD; *critical point drying*) ist ein physikalisches Verfahren. Dabei werden Flüssigkeiten aus Feststoffen extrahiert. Für die Extraktion macht man sich das Phasenverhalten eines Stoffes zu nutze. Organische Proben können somit getrocknet werden, ohne dabei zerstört zu werden. Dabei werden Schrumpfungen, Risse oder Porenvergrößerungen, die zu einer Änderung der Morphologie führen, vermieden. Bei diesem Verfahren wird Kohlendioxid als Medium

verwendet. Wasser und Kohlendioxid sind jedoch nicht gut mischbar, deshalb muss ein anderes Medium gefunden werden. Dieses Problem wird durch Aceton behoben. Durch eine aufsteigende Acetonreihe wird das Wasser aus den Proben entzogen. In einer Probenkammer wird das Aceton langsam mit flüssigem CO₂ ausgetauscht. Die Temperatur wird anschließend langsam auf 40 °C erhöht und am kritischen Punkt entsteht in komprimiertes Gas (überkritische Werte). Bei der Überschreitung des kritischen Punktes ist das Präparat getrocknet. Die Kritisch-Punkt-Trocknung wurde mit einer Kritisch-Punkt-Trocknungsanlage CPD 030 der Firma Bal-Tec durchgeführt.

3.1.8. Atomabsorptionsspektroskopie

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) ist eine Methode der Elementanalytik und dient zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Elementen. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass jedes Element spezifische Absorptionslinien besitzt. Jedes Atom im Grundzustand ist in der Lage eine bestimmte Wellenlänge des elektromagnetischen Spektrums zwischen 190 nm und 850 nm zu absorbieren. Es werden Lichtquellen verwendet, die die charakteristische Strahlung des gesuchten Elements abstrahlen, dadurch ist die Atomabsorption als selektive, elementspezifische, hochempfindliche Analysemethode verwendbar. Die Atome, die in der AAS vermessen werden, müssen in der Gasphase vorliegen um detektiert werden zu können. Es werden verschiedene Atomisierungsmethoden verwendet:

- Flammentechnik
- Graphitrohrtechnik
- Hybridtechnik
- Kaltdampftechnik

Die Flammentechnik und Graphitrohrtechnik sind die am häufigsten verwendeten Atomisierungsmethoden. Bei beiden Methoden werden die Proben durch Erhitzen in die Gasphase gebracht. Nach überführen der Probe in die Gasphase, werden die freien Atome mit elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Das Licht wird zum Teil von der Probe absorbiert und die Intensität des austretenden Lichtes wird gemessen. Die AAS wurde mit einem M-Series AA Spektrometer der Firma Thermo Electron Corporation durchgeführt.

3.1.9. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Dabei wird der physikalische Effekt der Fluoreszenz ausgenutzt. Autofluoreszente Proben oder Fluorochrome werden mit einem Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, diese strahlen nach wenigen Nanosekunden ein Licht anderer Wellenlänge wieder ab, welches detektiert werden kann. Das Prinzip des Mikroskops basiert auf der Trennung des intensiven Anregungslichts vom sehr viel schwächeren Fluoreszenzlicht. Dadurch kann das Fluoreszenzlicht mit einem hohen Kontrast auf dem Detektor abgebildet werden.

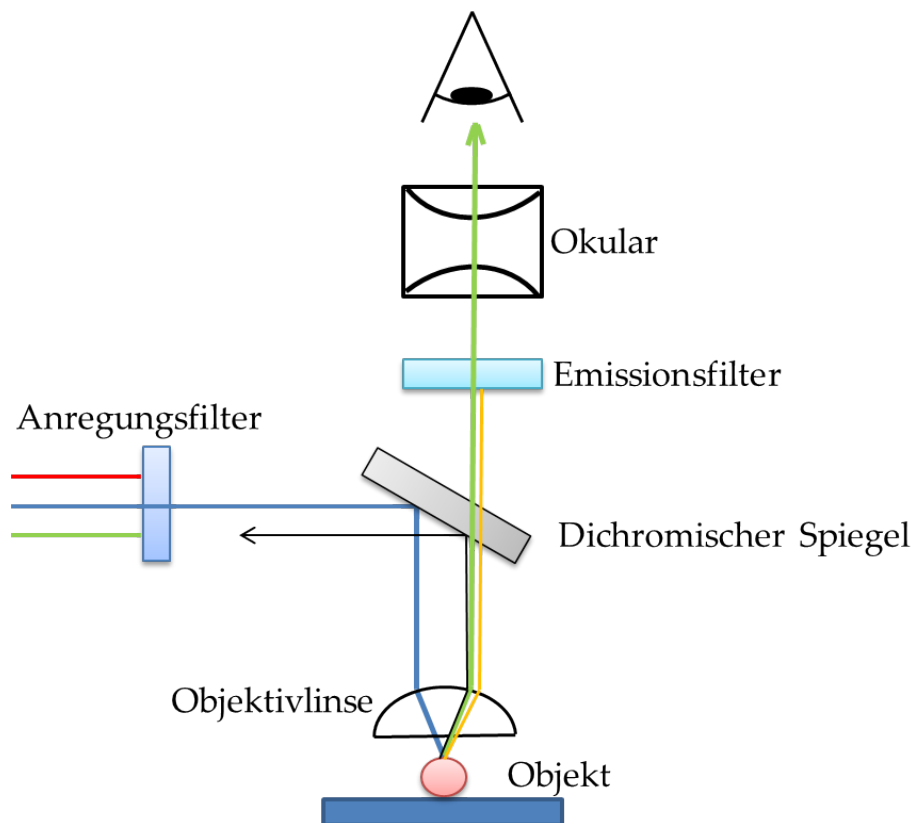


Abbildung 3.3.: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

In Abbildung 3.3 ist der schematische Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops dargestellt. Als Lichtquelle eignen sich Xenon-, Quecksilber- und Halogenlampen sowie Laser. Die Wahl der Lichtquelle ist abhängig von der zu untersuchenden Probe. Laser haben den Vorteil von monochromatischem Licht mit hohen Anregungsintensitäten, während die Lampen Licht über große Abschnitte des Spektrums emit-

3. Methoden

tieren. Die durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Axiovert 40 CFL Mikroskop von Zeiss aufgenommen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Thermochrome quecksilberhaltige Verbindungen

Unter Thermochromie versteht man die Eigenschaft einer Substanz, ihre Farbe temperaturabhängig reversibel zu verändern. Der Grund für diese Eigenschaft ist ein Phasenübergang erster oder zweiter Ordnung, der durch Temperaturänderung hervorgerufen werden kann.^[143,144] Thermochrome Verbindungen sind schon seit dem 19. Jahrhundert bekannt. Meusel untersuchte als erster im Jahre 1870 die Verbindungen Disilbertetraiodomercurat (Ag_2HgI_4) und Dikupfertetraiodomercurat (Cu_2HgI_4).^[145] Er stellte fest, dass beide Verbindungen temperaturbedingt von der β -Phase in die α -Phase wechseln. Die reversible Farbänderung von gelb nach rot erfolgt bei Ag_2HgI_4 bei 50 °C, Cu_2HgI_4 benötigt eine Temperatur von 70 °C um eine Farbänderung von orange nach braun zu ermöglichen. Mittels Röntgenpulverdiffraktometrie untersuchte Ketelaar die Kristallstrukturen dieser Verbindungen.^[146–150] Er beschrieb die β -Phase von Ag_2HgI_4 als pseudokubische tetragonale Struktur. Die Iodidanionen bilden dabei eine leicht verzerrte kubisch dichteste Kugelpackung. Die Tetraederlücken werden durch die Silberkationen und Quecksilber-(II)-Kationen besetzt. Die Kristallstruktur der β -Phase von Ag_2HgI_4 ist vergleichbar mit der Kristallstruktur von Chalkopyrit (CuFeS_2). In Abbildung 4.1 ist die Kristallstruktur von Ag_2HgI_4 im Vergleich zu Chalkopyrit dargestellt.

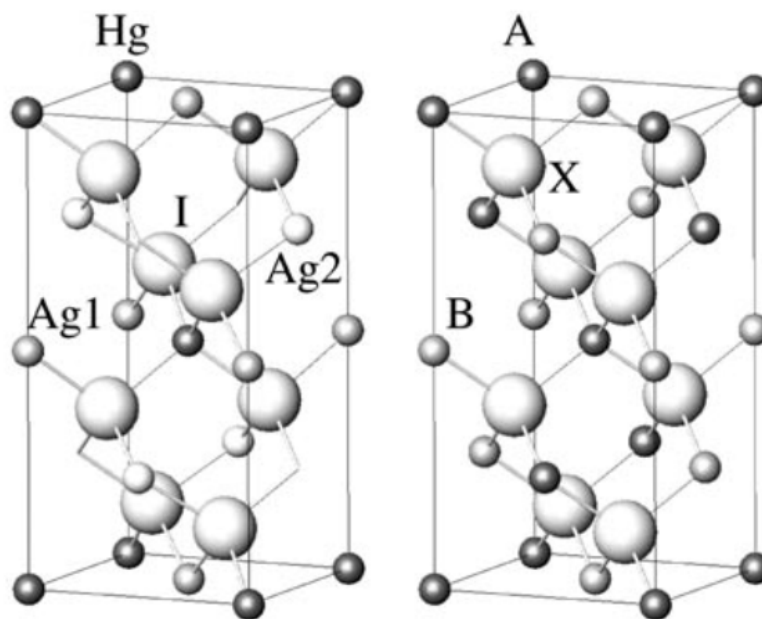


Abbildung 4.1.: Kristallstrukturen von Ag_2HgI_4 (β -Phase, links) und Chalkopyrit $\text{A}_2\text{B}_2\text{X}_4$ (rechts).^[151]

Die α -Phase der Ag_2HgI_4 -Verbindung zeigt Ähnlichkeit zur Zinkblendestruktur. Hierbei liegen im Gegensatz zur β -Phase die Iodidanionen in einer unverzerrt kubisch-dichtesten Kugelpackung vor. Die Kationen sind statistisch auf drei der vier Tetraederlücken verteilt, jeweils zwei mit Silber- und eine mit einem Quecksilberkation. In den 1980er Jahren wurden weitere Untersuchungen zur Thermochromie von Ag_2HgI_4 durchgeführt. Mittels Raman- und UV/Vis-Spektroskopie konnten weitere Einblicke in den Mechanismus der Farbänderung gegeben werden. Die Farbigkeit beider Phasen liegt in einem Charge-Transfer-Übergang zwischen dem HOMO-(*Highest Occupied Molecular Orbital*) und dem LUMO-(*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) Orbital.^[152,153] Im Ag_2HgI_4 hat das HOMO den Charakter eines Iod 5p-Orbitals und das LUMO den Charakter eines Quecksilber 6s-Orbitals. Von dem Betrag des Energieunterschiedes hängt es ab, wie leicht die Elektronen den angeregten Zustand erreichen. Beim Phasenübergang von der β -Phase zur α -Phase vergrößert sich der mittlere Abstand zwischen den Quecksilber- und Iodid-Ionen. Da die Übergangsenergie eines Charge-Transfer-Übergangs umgekehrt proportional zum Abstandsquadrat der Zentren ist, ergibt sich durch die Vergrößerung des Abstands eine kleinere Übergangsenergie. Es kommt zum Phasenübergang, die Farben sind charakteristisch für die Übergangsenergie. Da die Komplementärfar-

4. Ergebnisse und Diskussion

be gesehen wird, bedeutet das für die β -Phase, dass blaues Licht absorbiert wird (Komplementärfarbe = gelb), während die α -Phase energieärmeres grünes Licht absorbiert (Komplementärfarbe = orange bis rot).

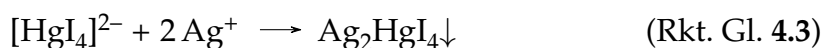
Im Vergleich zu Ag_2HgI_4 wird in diesem Kapitel auch das Quecksilber(II)-Iodid (HgI_2) besprochen. Bei dieser Verbindung existieren ebenfalls zwei Phasen, die temperaturabhängig geschaltet werden können. Die Übergangstemperatur liegt bei $127\text{ }^\circ\text{C}$ und somit sehr viel höher als beim Ag_2HgI_4 . Die rote α -Phase liegt unterhalb von $127\text{ }^\circ\text{C}$ vor, während die gelbe β -Phase oberhalb dieser Temperatur stabil ist. Die Farbgebung im HgI_2 ist ebenfalls auf Charge-Transfer-Übergänge zurückzuführen. Allerdings zeigt sich, dass die Übergangsenergie größer ist als in der Ag_2HgI_4 -Verbindung, da energiereicheres Licht beim Phasenübergang absorbiert wird. Die Kristallstruktur der Niedertemperaturphase ist ein eckenverknüpftes HgI_4 -Tetraeder, während die Hochtemperaturphase in linearen Einzelmolekülen vorliegt. Beim eckenverknüpften Tetraeder wird in einer kubisch dichtesten Packung von Iodionen alternierend zwischen die Iodionen-Doppelschichten in die Hälfte der Tetraederlücken Quecksilberionen eingebaut.^[154]

In diesem Abschnitt soll das elektrophoretische Verhalten von Ag_2HgI_4 - und HgI_2 -Nanopartikeln verglichen werden. Es war bekannt, dass Ag_2HgI_4 gut elektrophoretisch abgeschieden werden kann, und jetzt sollte geklärt werden, ob HgI_2 ähnliche oder gleiche Eigenschaften aufweist wie Ag_2HgI_4 .

4.2. Synthese von quecksilberhaltigen Nanopartikeln

4.2.1. Synthese und Funktionalisierung von Disilbertetraiodo-mercurat-Nanopartikeln (Ag_2HgI_4)

Die Synthese von Ag_2HgI_4 -Nanopartikeln erfolgt über eine Fällungsreaktion. Dafür werden zwei Stammlösungen angesetzt, die mittels einer Peristaltikpumpe zusammengegeben werden. Die erste Lösung ist eine 0,04 M K_2HgI_4 -Stammlösung (Lösung 1). Für die Herstellung werden 20 mmol $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 350 mL Reinstwasser vorgelegt und auf 90 °C erhitzt. 80 mmol KI werden in 80 ml Reinstwasser gelöst und der klaren Lösung zugetropft. Beim Zutropfen bildete sich zunächst ein roter Niederschlag von HgI_2 (Rkt. Gl. 4.1), der sich bei weiterer Zugabe von KI wieder auflöste (Rkt. Gl. 4.2). Nach dem Abkühlen der Lösung wurde die Lösung in einen Messkolben überführt und auf 500 mL aufgefüllt. Als zweite Stammlösung wurde eine 0,08 M AgNO_3 -Lösung (Lösung 2) angesetzt. Je 5 mL der Lösung 1 und Lösung 2 werden für die Synthese von Ag_2HgI_4 (Rkt. Gl. 4.3) mittels einer Peristaltikpumpe in ein Becherglas mit 20 mL vorgelegter Polymerlösung bekannter Konzentration gepumpt. Die Zugabe der Lösungen erfolgt innerhalb von 45 Sekunden.



4. Ergebnisse und Diskussion

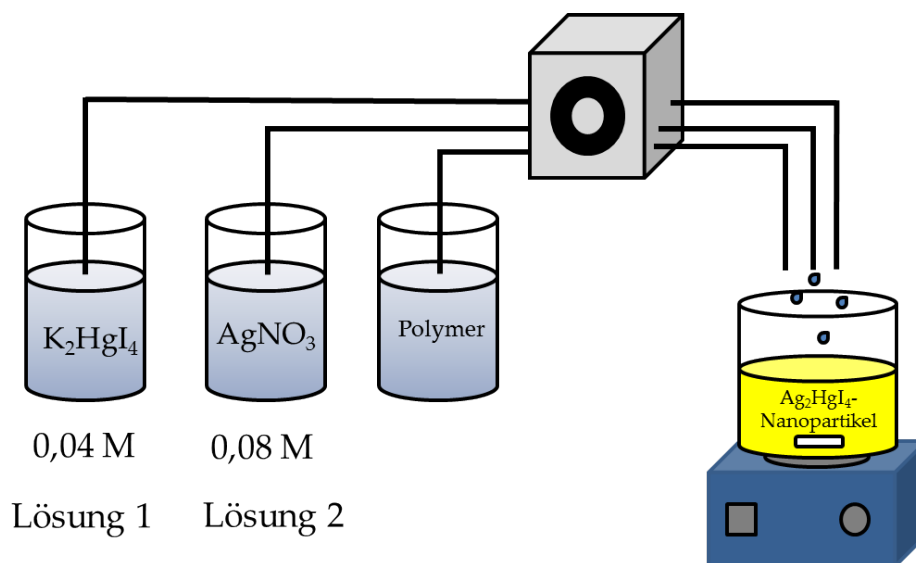


Abbildung 4.2.: Schematische Darstellung der Fällung von Disilbertetraiodomercurat-Nanopartikeln (Ag_2HgI_4).

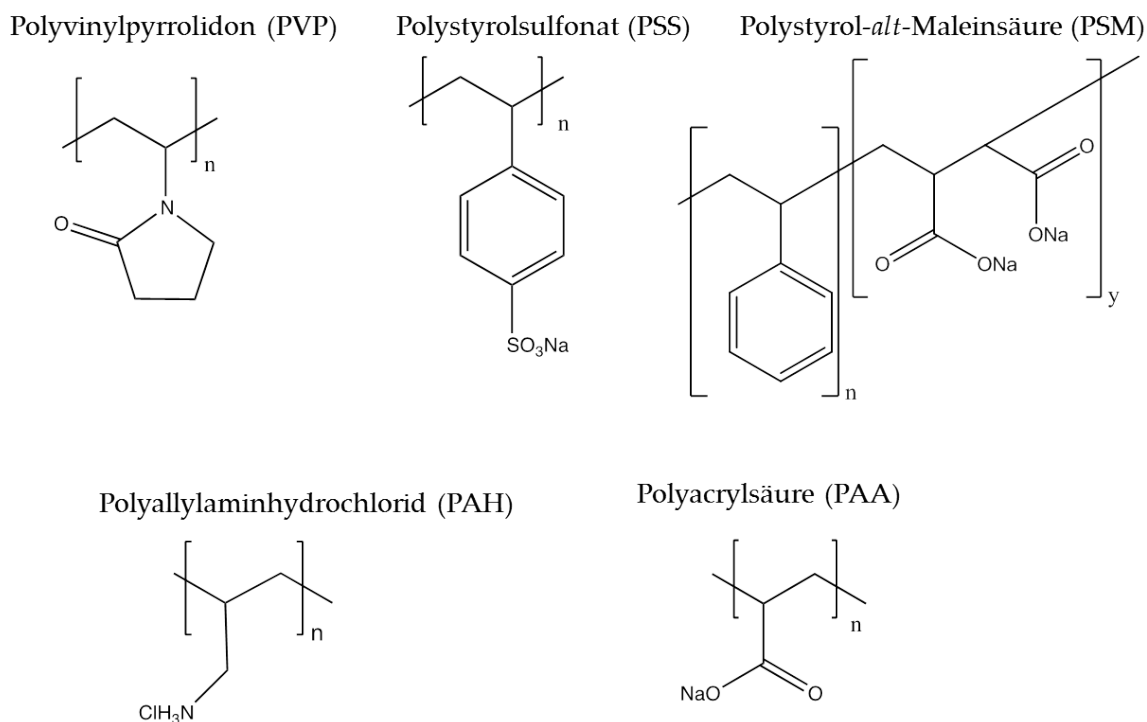


Abbildung 4.3.: Strukturen der für die Funktionalisierung verwendeten Polymere.

Für die Stabilisierung der Partikel wurden fünf Polymere verwendet. Ein Polykation Polyallylaminhydrochlorid (PAH), ein neutrales Polymer Polyvinylpyrrolidin (PVP) und drei Polyanionen Polyacrylsäure (PAA), Polystyrolsulfonat (PSS) und

Polystyrol-*alt*-Maleinsäure (PSM). Abbildung 4.3 zeigt die Strukturen der Polymere. Die Aufarbeitung der Partikel erfolgt mittels Zentrifugation. Die Proben werden jeweils zwei Stunden bei 3500 rpm (1509 g) zentrifugiert, drei mal mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Die erhaltenen Partikel wurden nach der Trocknung gemörsert.

4.2.2. Charakterisierung von funktionalisierten Ag_2HgI_4 -Nanopartikeln

4.2.2.1. Charakterisierung von PAA-funktionalisierten Ag_2HgI_4 -Nanopartikeln

Im Abschnitt 4.2.1 wurde die Herstellung von Ag_2HgI_4 erklärt. Die Funktionalisierung der Partikel wurde mit fünf verschiedenen Polymeren durchgeführt. Mittels DLS-Messungen wurde die Größe und das Zetapotential der Partikel bestimmt. Die ausgewählten Polymerkonzentrationen wurden angelehnt an die Diplomarbeit von André Geist.^[155] Die verwendeten Polymere sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

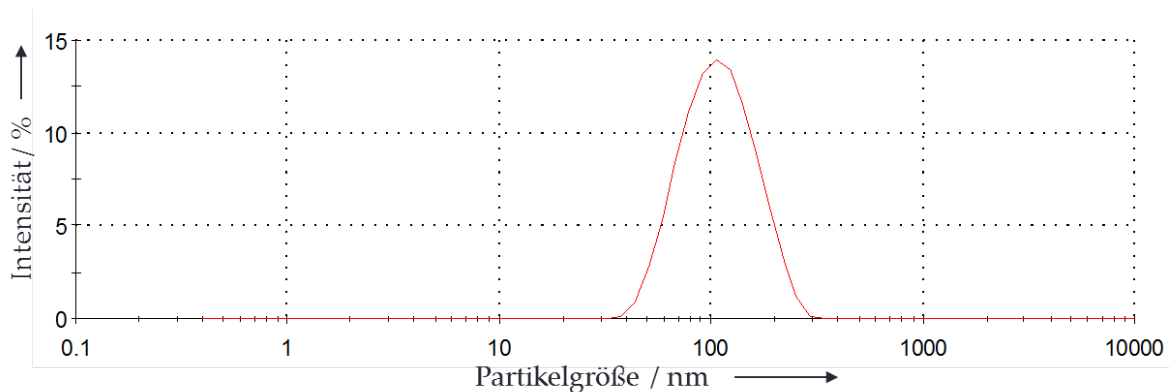


Abbildung 4.4.: DLS-Messung von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PAA.

4. Ergebnisse und Diskussion

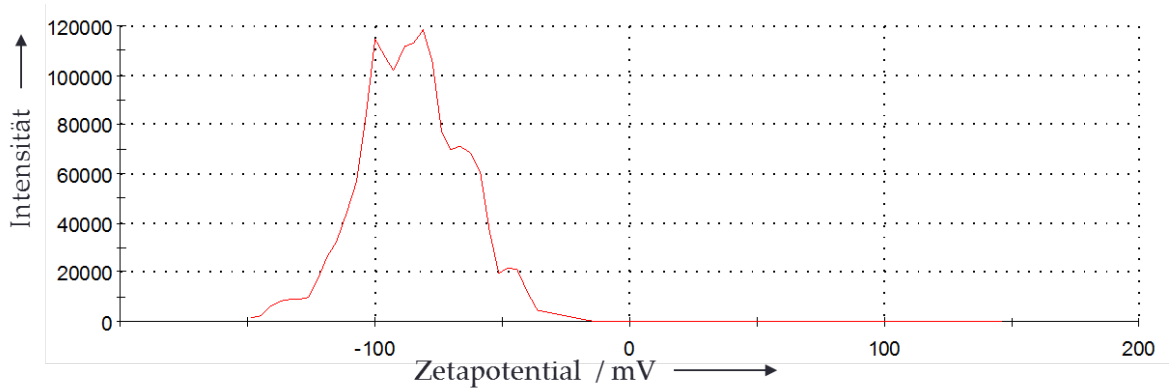


Abbildung 4.5.: Zetapotential-Messung von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PAA.

Die DLS-Messung von PAA-funktionalisierten Ag_2HgI_4 -Partikeln zeigte einen durchschnittlichen hydrodynamischen Radius von 96 nm (Abbildung 4.4). Der Polydispersionsindex (PDI) der Partikel lag bei 0,155, was für eine monodisperse Dispersion spricht. Das Zetapotential der Partikel lag bei einem Wert von -86 ± 21 mV. Mit diesem Zetapotential sind die Partikel elektrostatisch stabilisiert. Die gewählte PAA-Konzentration lag bei $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 4.6) zeigen für PAA-funktionalisierte Ag_2HgI_4 -Partikel einen Durchmesser zwischen 130 nm bis 350 nm. Es sind allerdings auch kleinere Partikel von 50 nm zu erkennen, was den Schluss zulässt, dass die Partikel agglomeriert waren. Die REM-Aufnahme wurde von aufgereinigten und getrockneten Partikeln aufgenommen.

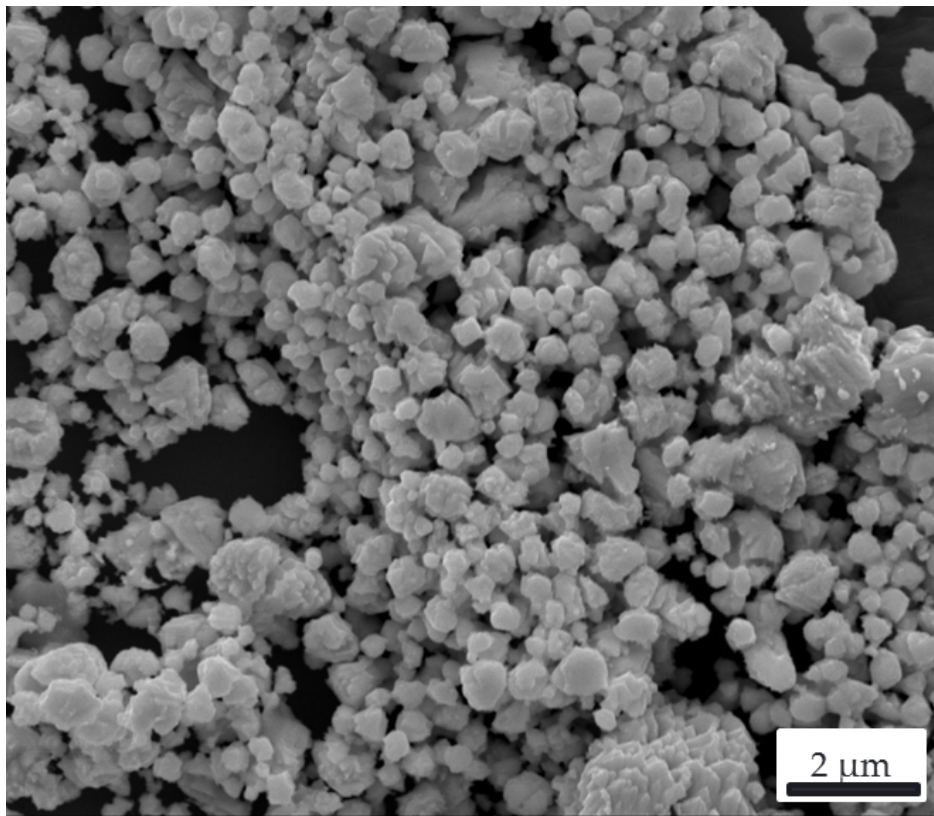


Abbildung 4.6.: REM-Aufnahme von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PAA.

Die Untersuchung des Farbumschlags der Partikel in Dispersion wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt. In Abbildung 4.7 sind die entsprechenden UV/Vis-Spektren dargestellt. Bei niedrigen Temperaturen von 10 – 20 °C lag das Absorptionsmaximum bei 483 nm. Wenn die Temperatur leicht erhöht wurde, wurde das Absorptionsmaximum langsam zu höheren Wellenlängen verschoben. Bei 30 °C war die Verschiebung noch gering. Die Verschiebung wurde ab einer Temperatur von 40 °C gut erkennbar. Je näher man der Phasenübergangstemperatur kam, desto weiter wurde das Maximum verschoben. Es war erkennbar, dass das Maximum bei höheren Wellenlängen an Intensität abnahm, bis kein Peak mehr vorhanden war. Das Maximum bei 40 °C lag bei 490 nm. Ab 50 °C war der Peak so flach, dass keine genaue Aussage über die Wellenlänge getroffen werden konnte. Es war zu erkennen, dass die Probe über alle untersuchten Wellenlängenbereiche absorbierte. In Richtung der kürzeren Wellenlängen nahm die Absorption zu. Hier spielt der *Faraday-Tyndall*-Effekt eine Rolle. Da die Dispersion Nanopartikel enthält, streuen diese das einfallende Licht. Dadurch findet eine Absorption statt, die allerdings nicht nur durch Absorption des Lichtes, sondern auch durch Streuung des Lichtes

4. Ergebnisse und Diskussion

an den Partikeln hervorgerufen wird. Dieses Phänomen ist wellenlängenabhängig und tritt stärker bei kürzeren als bei längeren Wellenlängen auf.

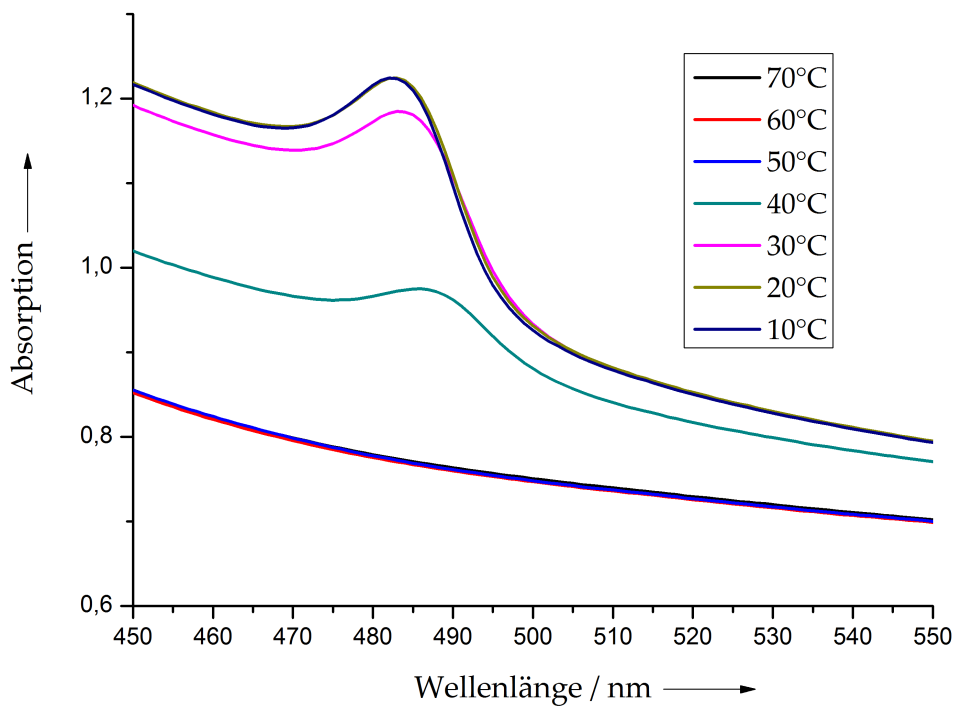


Abbildung 4.7.: UV/Vis-Spektren von Ag₂HgI₄, funktionalisiert mit PAA, bei unterschiedlichen Temperaturen.

Zur weiteren Analyse der Verbindung wurde ein Röntgenpulverdiffraktogramm aufgenommen. Die Verbindung zeigte alle typischen Reflexe für β -Ag₂HgI₄. Abbildung 4.8 zeigt die Reflexe für PAA-funktionalisiertes Ag₂HgI₄.

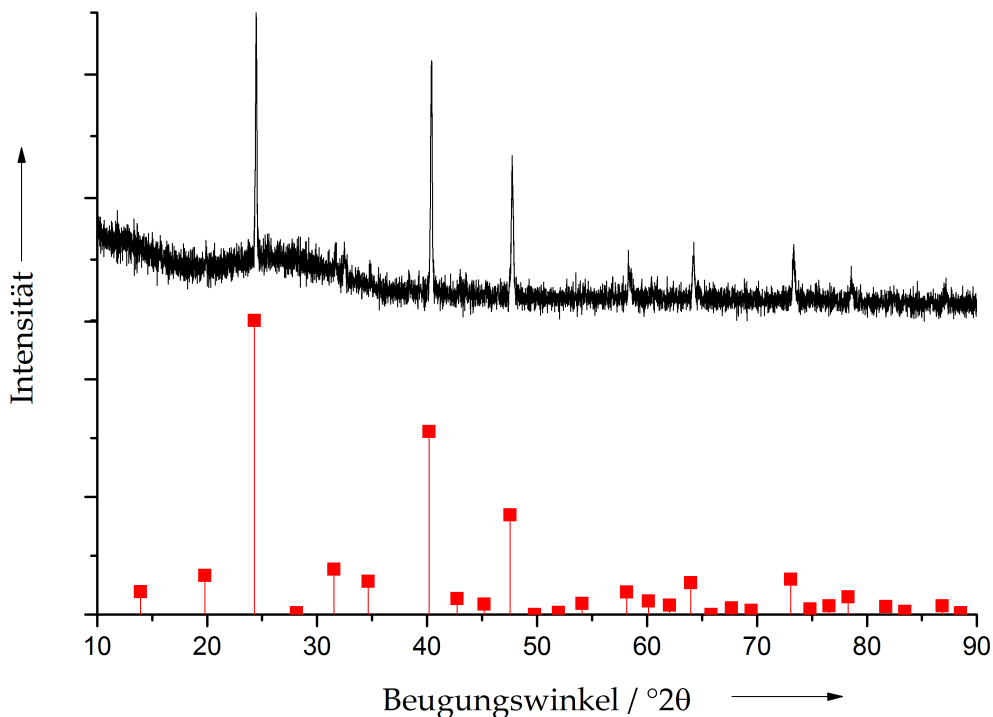


Abbildung 4.8.: Röntgenpulverdiffraktogramm von Ag_2HgI_4 mit PAA funktionalisiert. Zum Vergleich sind die Literaturreflexe von $\beta\text{-Ag}_2\text{HgI}_4$ [ICDD 74-0168] aufgeführt (rot).

Die Umwandlungstemperatur wurde mittels DSC-Messung bestimmt. In Abbildung 4.9 ist der Graph der Messung abgebildet. Beim Aufheizen der Probe konnte ein endothermes Ereignis registriert werden, welches für eine Phasenumwandlung von der β -Phase in die α -Phase sprach. Dieser Übergang wurde bei einer Temperatur von $50,7^\circ\text{C}$ beobachtet. Das exotherme Ereignis wurde beim Abkühlen der Probe aufgezeichnet. Der Phasenübergang war verzögert und fand bei einer Temperatur von $28,6^\circ\text{C}$ statt. Die Enthalpie beim Phasenübergang von der β - zur α -Phase betrug $7,6\text{ J g}^{-1}$. Die Enthalpie des Phasenübergangs von der α - zur β -Phase betrug $-6,2\text{ J g}^{-1}$. Eine Phasenumwandlung läuft theoretisch innerhalb von wenigen Sekunden ab, deshalb sollten die Peaks schmal sein. Laut der DSC-Messung wurden jedoch breite Peaks gemessen, was auf eine zu langsame Änderung der Temperatur zurückzuführen war. Die Phasenumwandlung wurde durch eine zu langsame Temperaturerhöhung (5 K min^{-1} Schritten) verzögert, was zu diesen breiteren Peaks führte.

4. Ergebnisse und Diskussion

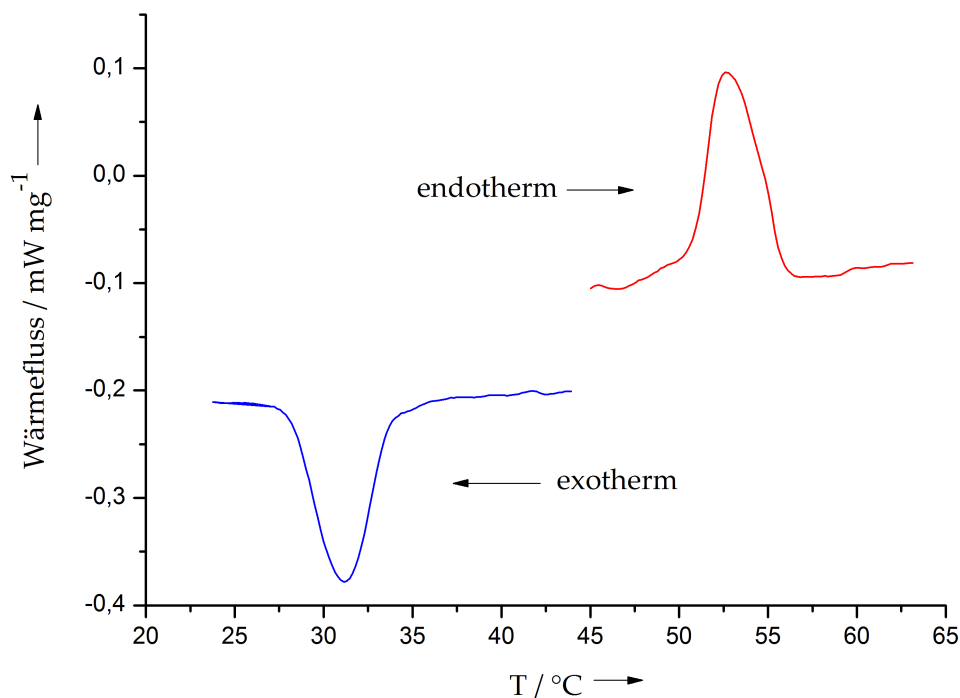


Abbildung 4.9.: Graph der Dynamischen Differenzkalorimetrie von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PAA. Rot = endothermes Ereignis (Heizen), blau = exothermes Ereignis (Kühlen)

4.2.2.2. Charakterisierung von PAH-funktionalisierten Ag_2HgI_4 -Nanopartikeln

Das nächste Polymer, welches zur Stabilisierung eingesetzt wurde, war PAH. Die DLS-Kurven zeigten eine Größe von 67 nm für den durchschnittlichen hydrodynamischen Radius (Abbildung 4.10). Der PDI lag mit einem Wert von 0,143 wiederum unter einem Wert von 0,3, was für einen monodispersen Charakter der Dispersion sprach. Das gemessene Zetapotential lag bei dieser Polykation bei 61 ± 12 mV, was wiederum für eine gute elektrosterische Stabilisierung sprach. Für die Polymerkonzentration von PAH wurde ein Wert von 2 g L^{-1} gewählt. Die REM-Aufnahme (Abbildung 4.12) von PAH-funktionalisierten Partikeln wurde von aufgereinigten Partikeln aufgenommen. Der Durchmesser, der mittels REM bestimmt wurde, lag bei 130 nm bis 400 nm.

4. Ergebnisse und Diskussion

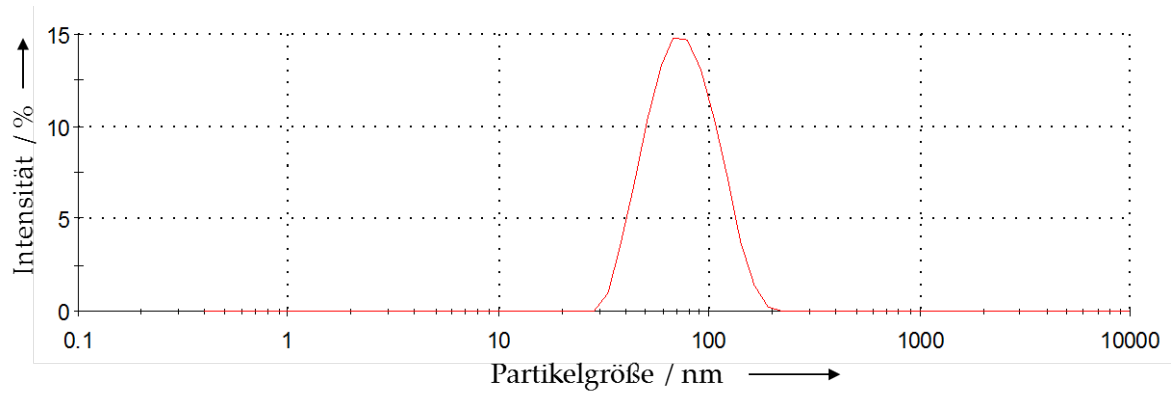


Abbildung 4.10.: DLS-Messung von Ag_2HgI_4 funktionalisiert mit PAH.

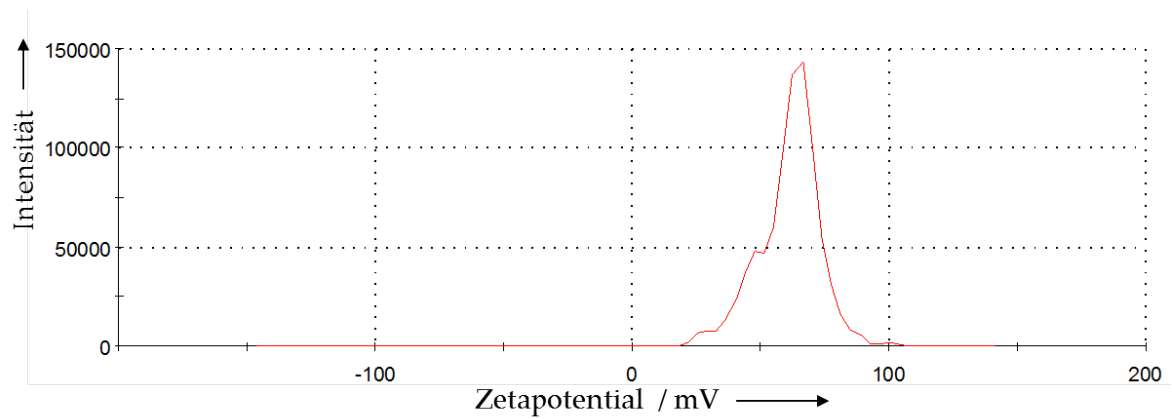


Abbildung 4.11.: Zetapotential-Messung von Ag_2HgI_4 funktionalisiert mit PAH.

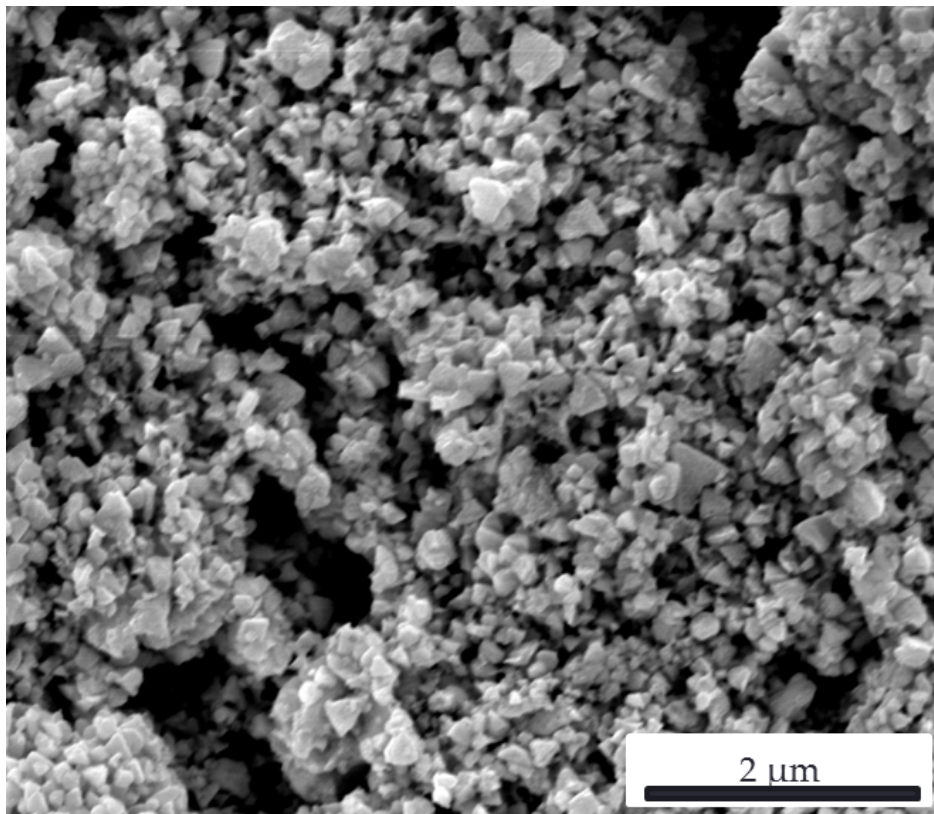


Abbildung 4.12.: REM-Aufnahme von Ag₂HgI₄, funktionalisiert mit PAH.

Die Untersuchung des Farbumschlags wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt. Es wurden Temperaturen von 10 – 70 °C untersucht. Die thermochrome Temperatur lag hier zwischen 40 – 50 °C. Die Maxima bei niedrigen Temperaturen waren sehr gut auszumachen. Die Maxima bei 10 – 20 °C waren identisch und lagen bei einer Wellenlänge von 482 nm. Das Maximum bei 30 °C wurde leicht in Richtung höherer Wellenlängen verschoben und lag bei 485 nm. Umso näher man der thermochromen Temperatur kam, umso weiter wurde das Absorptionsmaximum in Richtung der höheren Wellenlängen verschoben. Bei 40 °C lag das Maximum bei 487 nm. Bei einer Temperatur von 50 °C war das Maximum nur noch sehr schwer auszumachen, es lag bei etwa 505 nm. Alle Messungen über 50 °C zeigten keine eindeutigen Peaks, sodass zu diesem Temperaturbereich keine Aussage gemacht werden konnte.

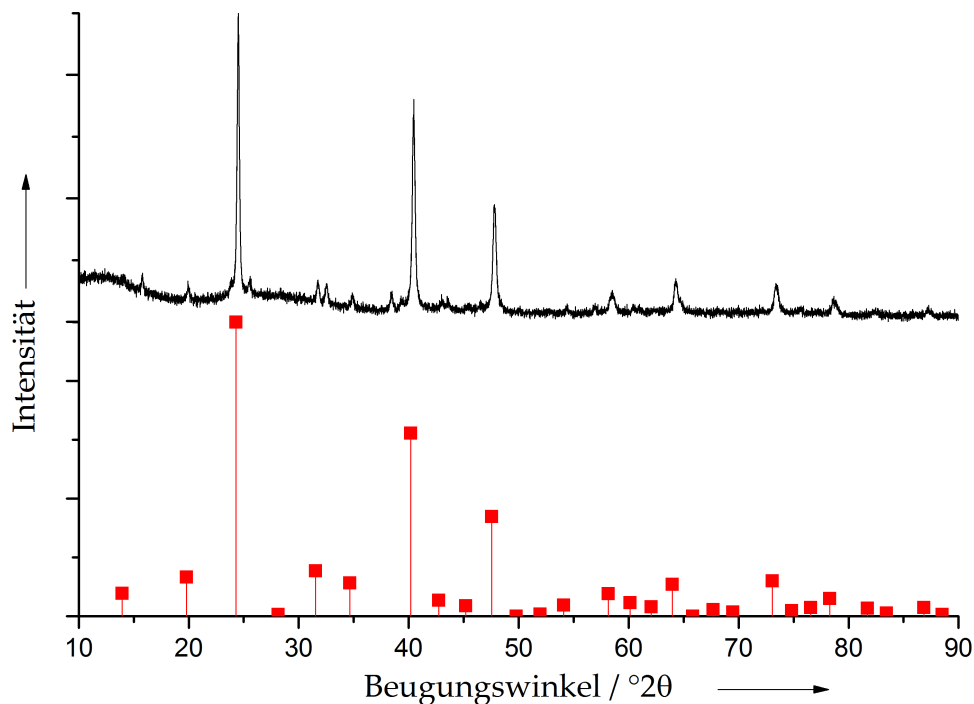


Abbildung 4.13.: XRD-Spektrum von Ag_2HgI_4 mit PAH funktionalisiert. Zum Vergleich sind die Literaturreflexe von $\beta\text{-Ag}_2\text{HgI}_4$ [ICDD 74-0168] aufgeführt (rot).

Um die Reinheit der gefällten Nanopartikel zu untersuchen, wurden XRD-Diffraktogramme aufgenommen. Diese zeigten die typischen Reflexe für $\beta\text{-Ag}_2\text{HgI}_4$. In Abbildung 4.13 ist das Diffraktogramm für PAH-funktionalisierte Ag_2HgI_4 -Nanopartikel dargestellt. Das Diffraktogramm zeigt, dass reines $\beta\text{-Ag}_2\text{HgI}_4$ hergestellt wurde.

4. Ergebnisse und Diskussion

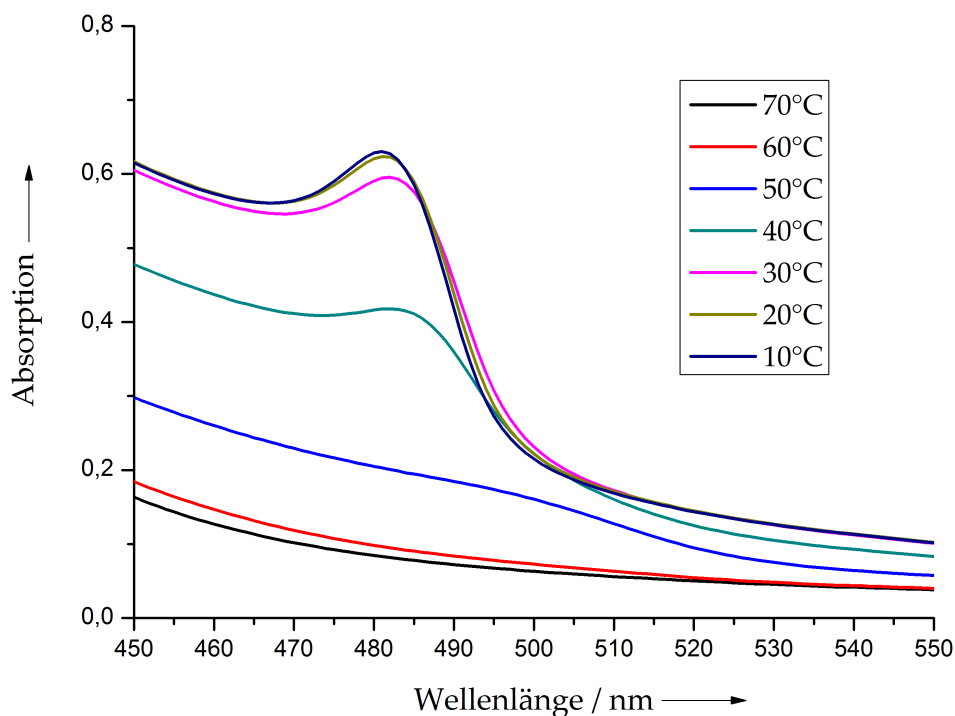


Abbildung 4.14.: UV/Vis-Spektren von Ag_2HgI_4 funktionalisiert mit PAH, bei unterschiedlichen Temperaturen.

4.2.2.3. Charakterisierung von PVP-funktionalisierten Ag_2HgI_4 -Nanopartikeln

Die Charakterisierung von PVP-funktionalisierten Ag_2HgI_4 -Nanopartikeln zeigte einen durchschnittlichen hydrodynamischen Radius von 68 nm. Die Größe wurde mittels DLS-Messung bestimmt. Der PDI der Dispersion lag bei 0,081 und zeigte einen monodispersen Charakter. Das gemessene Zetapotential lag mit dieser Funktionalisierung bei -26 ± 19 mV. Trotz des geringen Zetapotentials ist die Dispersion sterisch stabilisiert. Die verwendete PVP-Konzentration lag bei 4 g L^{-1} .

4. Ergebnisse und Diskussion

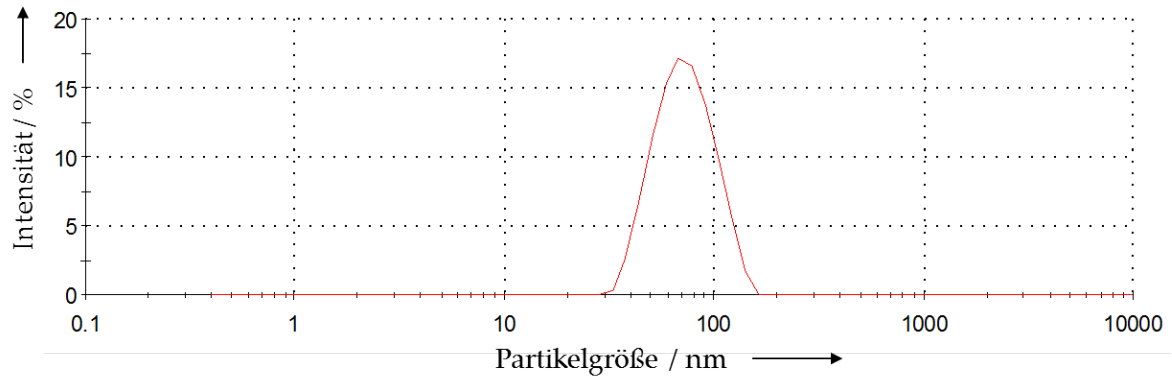


Abbildung 4.15.: DLS-Messung von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PVP.

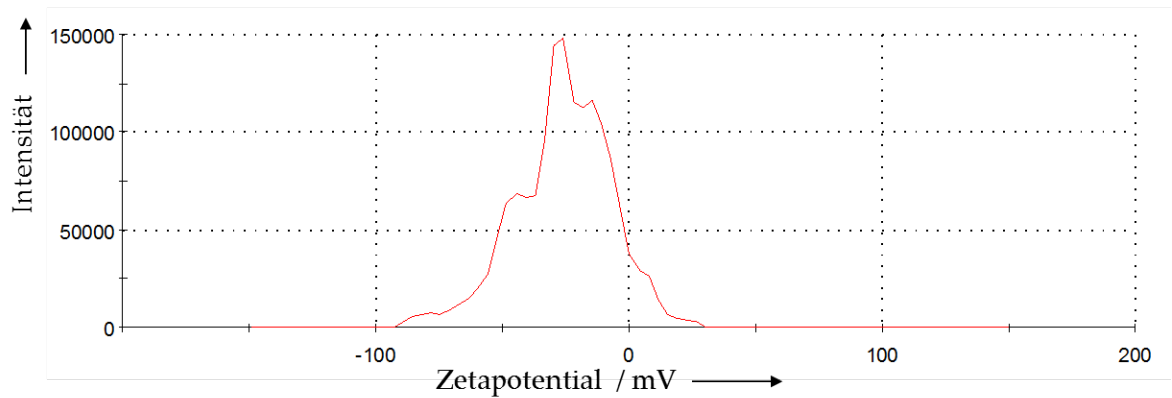


Abbildung 4.16.: Zetapotential-Messung von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PVP.

Die ermittelten Größen der REM-Aufnahmen zeigten, dass die Partikel einen Durchmesser zwischen 40 nm und 110 nm besaßen.

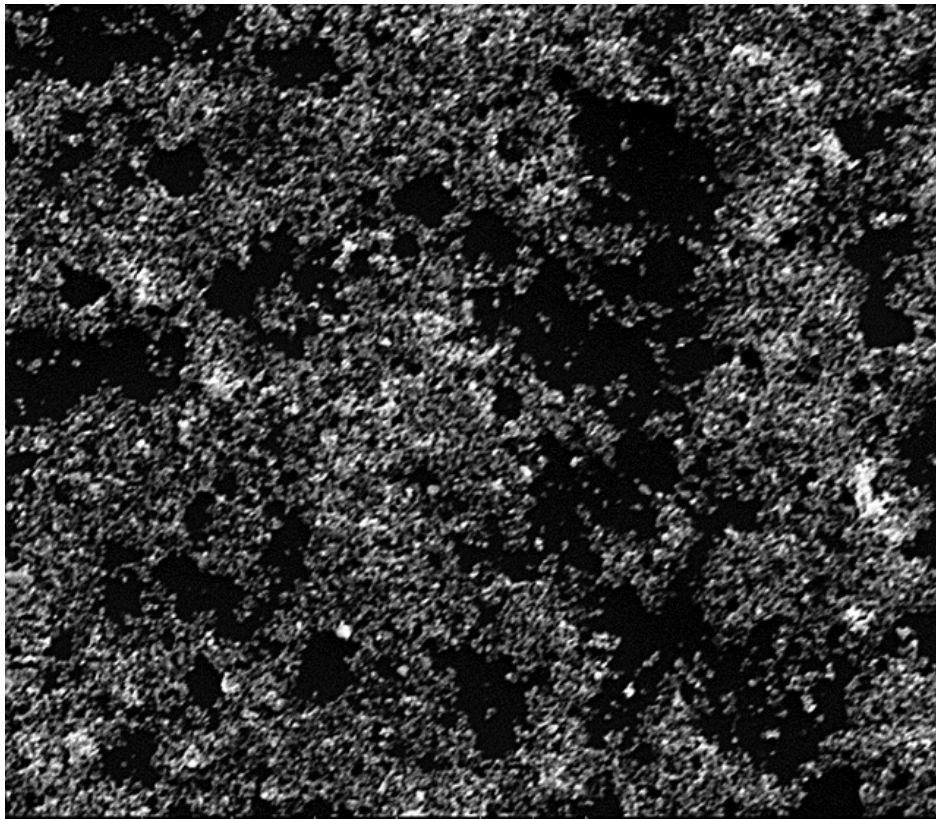


Abbildung 4.17.: REM-Aufnahme von Ag₂HgI₄, funktionalisiert mit PVP.

Auch bei diesen Partikeln wurde die thermochrome Temperatur mittels UV/Vis-Spektroskopie ermittelt. Die Temperaturspanne, die untersucht wurde, lag bei 10 – 70 °C. Die zu untersuchende Probe zeigte bei niedrigen Temperaturen sehr gut auszumachende Absorptionsmaxima. Die bei 10 – 20 °C ermittelten Absorptionsmaxima lagen bei einer Wellenlänge von 480 nm. Die Verschiebung in den längerwelligen Bereich war bei 30 °C sehr gering. Das ermittelte Maximum lag bei 483 nm. Ab einer Temperatur von 40 °C war es bei diesen Partikeln schwierig, die Absorptionsmaxima klar zu erkennen, da die Kurve sehr flach wurde. Das Absorptionsmaximum lag bei etwa 500 nm. Alle weiteren untersuchten Temperaturen zeigten keine Absorption.

4. Ergebnisse und Diskussion

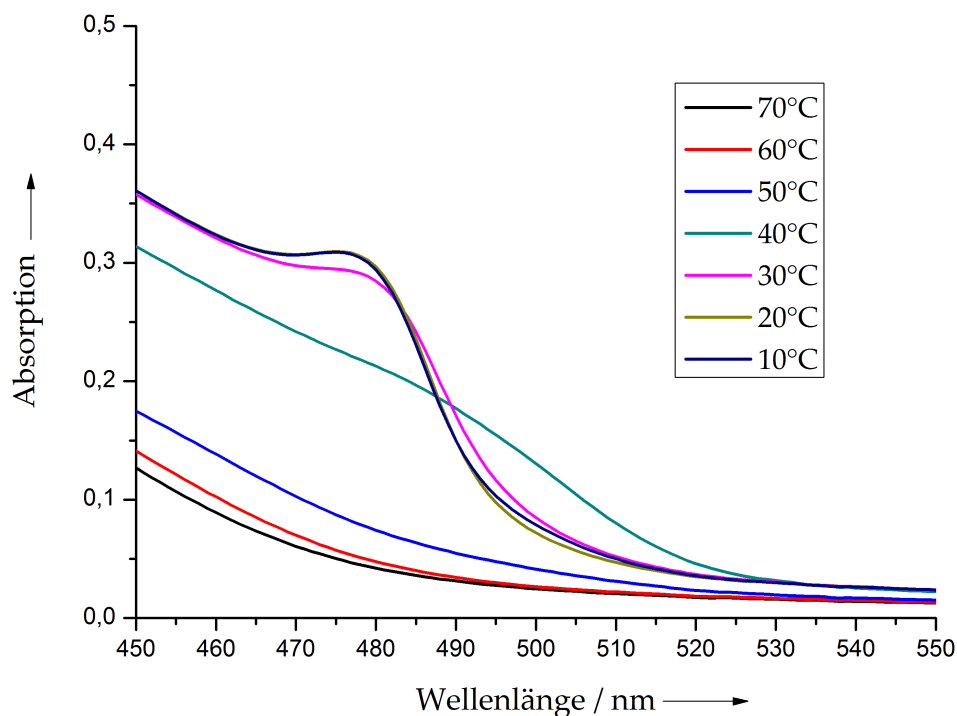


Abbildung 4.18.: UV/Vis-Spektren von Ag₂HgI₄, funktionalisiert mit PVP, bei unterschiedlichen Temperaturen.

Untersuchungen der PVP-funktionalisierten Nanopartikel mittels XRD zeigten keine Verunreinigung mit AgI. Die Reflexe waren etwas breiter als bei den anderen untersuchten Proben. Sie zeigten aber die eindeutigen Reflexe für β -Ag₂HgI₄. Das Pulverdiffraktogramm ist in Abbildung 4.19 gezeigt.

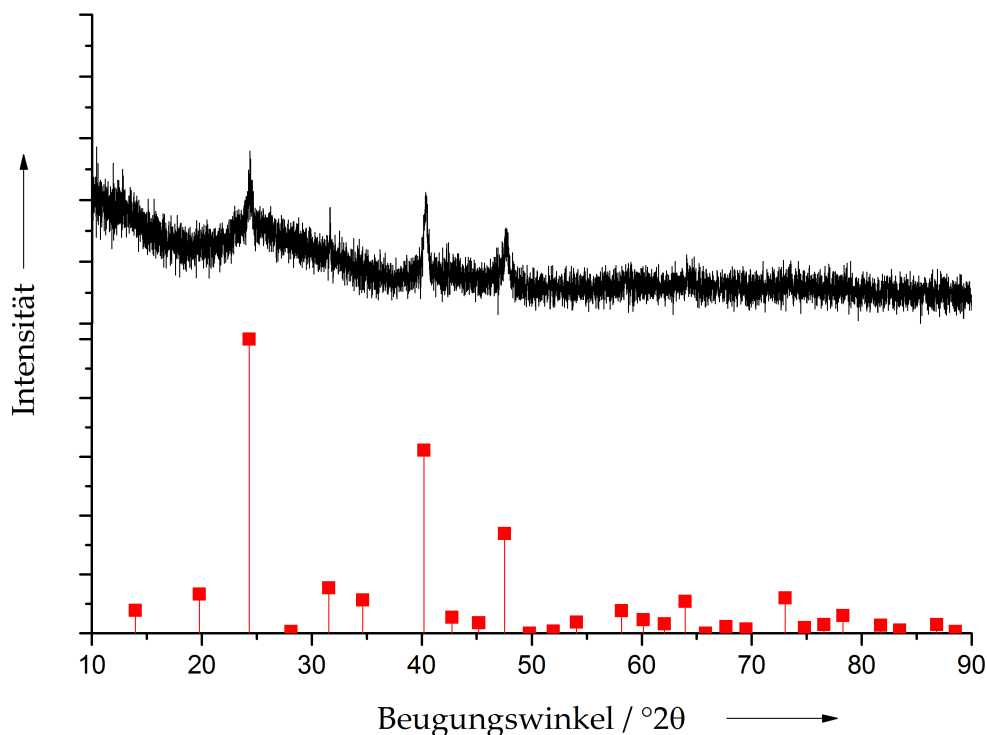


Abbildung 4.19.: XRD-Spektrum von Ag_2HgI_4 mit PVP funktionalisiert. Zum Vergleich sind die Literaturreflexe von $\beta\text{-Ag}_2\text{HgI}_4$ [ICDD 74-0168] aufgeführt (rot).

Die Messungen zur Phasenumwandlung zeigten bei PVP-funktionalisierten Partikeln beim Erwärmen einen endothermen Verlauf. Die Phasenumwandlung von der β - in die α -Phase fand bei $42,7^\circ\text{C}$ statt. Die Enthalpie betrug $1,7\text{ J g}^{-1}$. Ein exothermer Verlauf konnte nicht bestimmt werden.

4.2.2.4. Charakterisierung von PSS-funktionalisierten Ag_2HgI_4 -Nanopartikeln

Die DLS-Messung der PSS-funktionalisierten Ag_2HgI_4 -Nanopartikel zeigte einen hydrodynamischen Radius von 97 nm (Abbildung 4.20). Der PDI lag bei $0,218$, was für eine monodisperse Dispersion spricht. Das gemessene Zetapotential der Partikel betrug $-63 \pm 18\text{ mV}$ (Abbildung 4.21). Dieses Zetapotential belegte eine elektrostatische Stabilisierung der Partikel. Die verwendete Polymerkonzentration betrug 4 g L^{-1} .

4. Ergebnisse und Diskussion

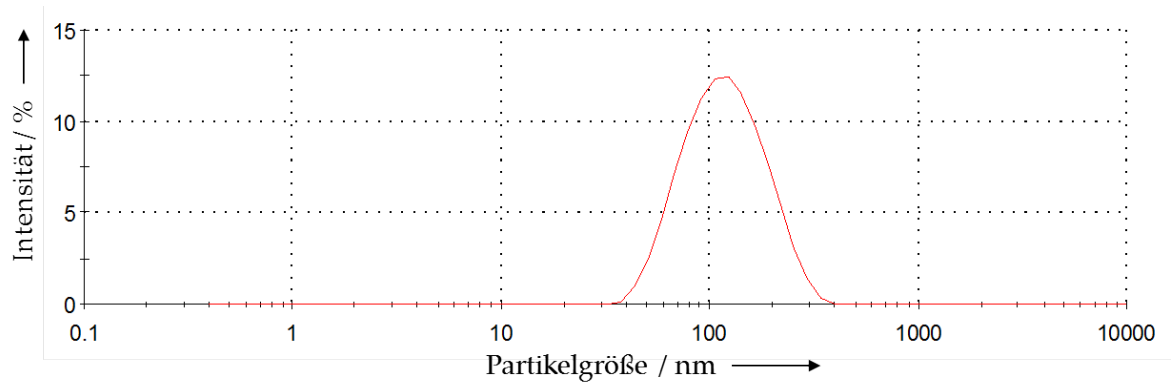


Abbildung 4.20.: DLS-Messung von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PSS.

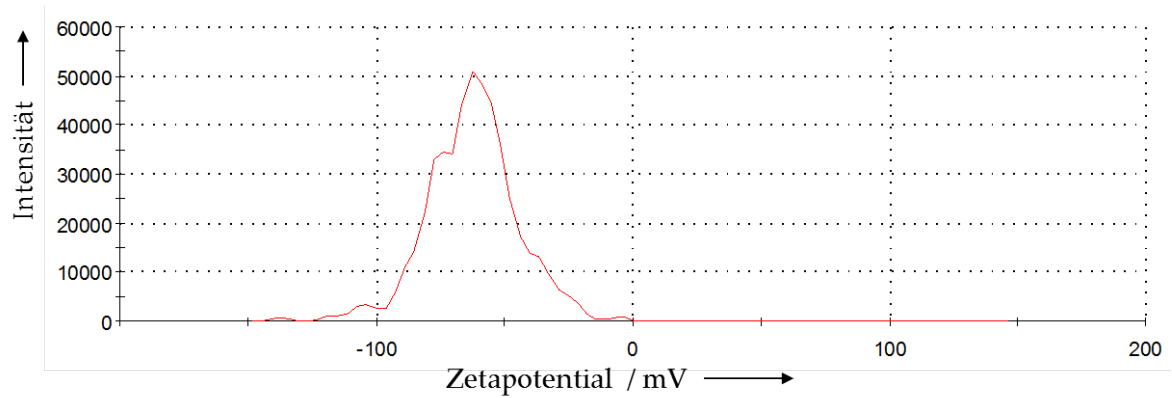


Abbildung 4.21.: Zetapotential-Messung von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PSS.

Die REM-Aufnahme der PSS-funktionalisierten Partikel zeigte eine Größe von 10 nm bis 300 nm (Abbildung 4.22).

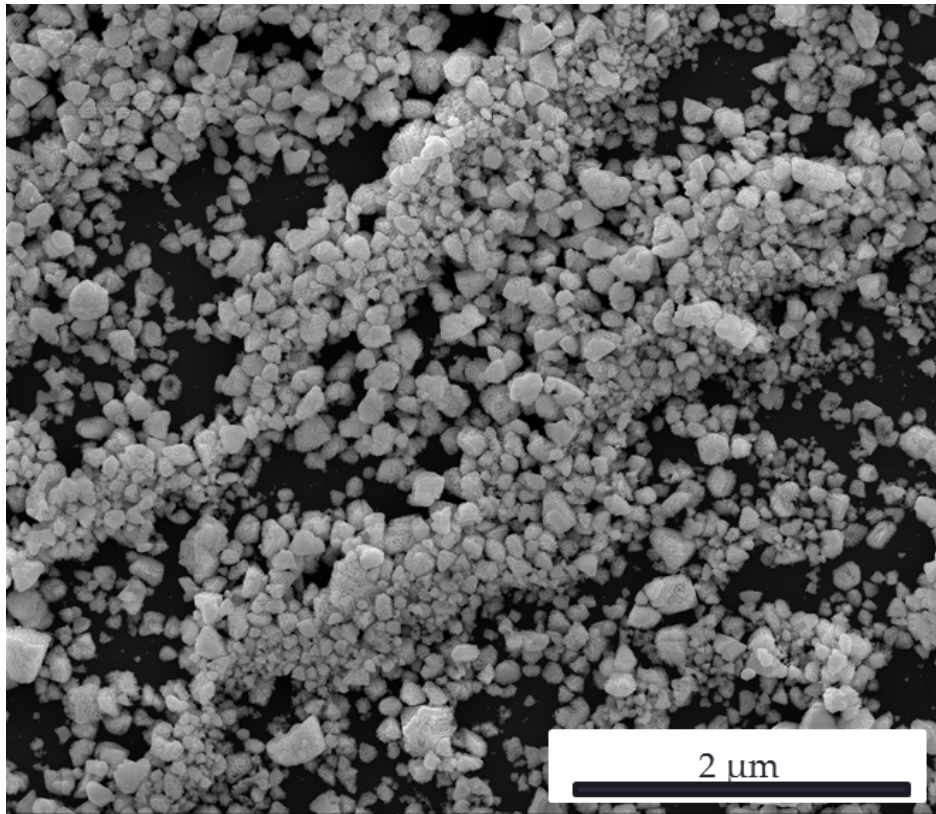


Abbildung 4.22.: REM-Aufnahme von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PSS.

Die Untersuchung des Farbumschlags wurde wiederum mittels UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt. Es wurden Temperaturen von 10 – 70 °C untersucht. Die thermochrome Temperatur lag hier zwischen 40 – 50 °C. Die Maxima bei niedrigen Temperaturen waren sehr gut auszumachen. Die Maxima bei 10 – 20 °C waren identisch und lagen bei einer Wellenlänge von 490 nm. Das Maximum bei 30 °C war leicht in Richtung der größeren Wellenlängen verschoben und lag bei 492 nm. Umso näher man der thermochromen Temperatur kam, umso weiter wurde das Absorptionsmaximum in Richtung größerer Wellenlängen verschoben. Bei 40 °C lag das Maximum bei 495 nm. Bei einer Temperatur ab 50 °C war keine Absorption mehr erkennbar.

Um die Reinheit der gefällten Nanopartikel zu untersuchen, wurden Röntgenpulverdiffraktogramme aufgenommen. Diese zeigten die typischen Reflexe für β - Ag_2HgI_4 . In Abbildung 4.23 ist das Spektrum für PSS-funktionalisierte Ag_2HgI_4 -Nanopartikel dargestellt. Es sind Reflexe zu erkennen, die auf eine Verunreinigung mit Silberiodid zurück zu führen sind.

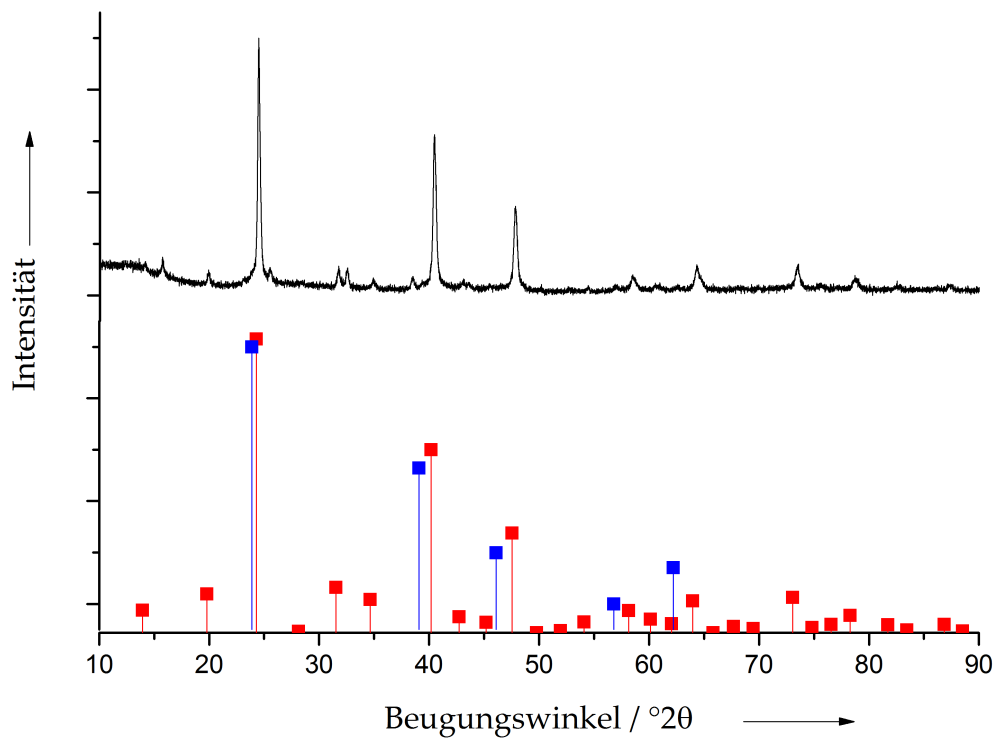


Abbildung 4.23.: XRD-Spektrum von Ag_2HgI_4 mit PSS funktionalisiert. Zum Vergleich sind die Literaturreflexe von $\beta\text{-Ag}_2\text{HgI}_4$ [ICDD 74-0168] (rot) und Silberiodid [ICDD 09-0399] (blau) aufgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

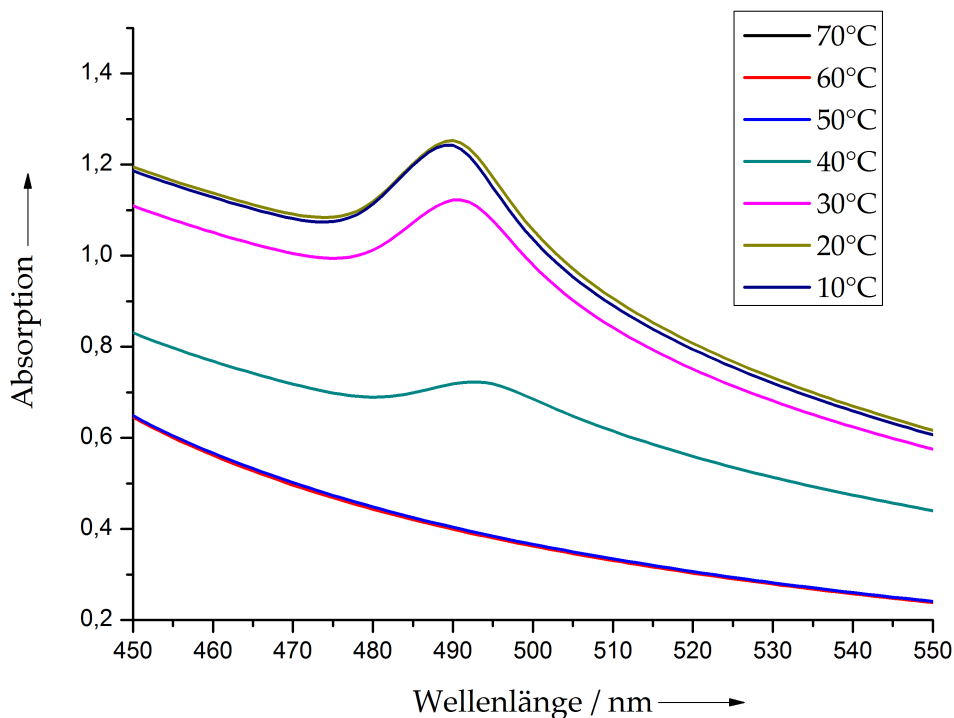


Abbildung 4.24.: UV/Vis-Spektren von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PSS, bei unterschiedlichen Temperaturen.

Für diese funktionalisierten Partikel wurde die thermochrome Temperatur mittels DSC bestimmt (Abbildung 4.25). Das Aufheizen der Probe zeigte ein endothermes Ereignis, welches die Phasenumwandlung von der β -Phase in die α -Phase widerspiegelte. Die Phasenumwandlung wurde bei einer Temperatur von $48,2^\circ\text{C}$ beobachtet. Beim Abkühlen der Probe zeigte sich eine Verzögerung des Phasenübergangs mit einer *Onset*-Temperatur von $29,7^\circ\text{C}$. Dieser Phasenübergang war ein exothermes Ereignis. Die Enthalpie des endothermen Phasenübergangs von der β -Phase in die α -Phase betrug $8,739\text{ J g}^{-1}$. Beim Aufheizen zeigte sich im Kurvenverlauf eine leichte Schulter, welche auf einen zweiten Peak hindeuten kann. Diese Schulter war etwas intensiver in der Abkühlphase zu sehen. Dieses Verhalten in der Abkühlphase wurde schon für Polymerpartikel beobachtet.^[9] Dieses Phänomen wurde schon häufiger beobachtet und untersucht. Dafür wurde ein Einfluss der Probenpräparation sowie Verunreinigungen mit Sibiiodid, die zu einer metastabilen Phase führen können, für dieses Phänomen verantwortlich gemacht.^[156–158] Durch die Schulter veränderte sich die Breite des Peaks, besonders beim exothermen Verlauf.

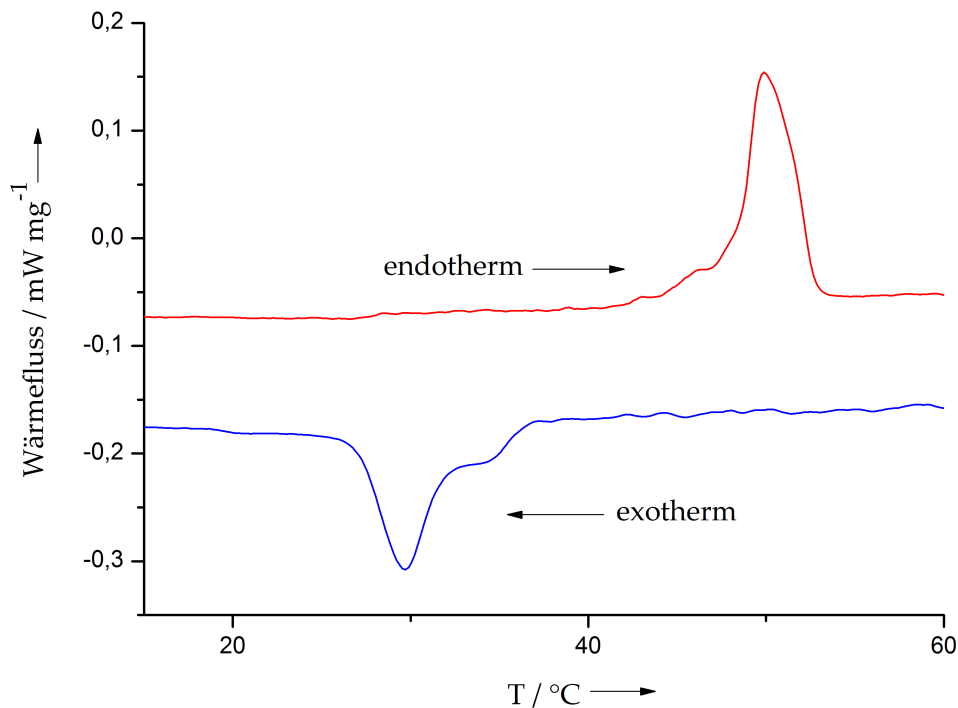


Abbildung 4.25.: Graph der Dynamischen Differenzkalorimetrie von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PSS. Rot = endothermes Ereignis (Heizen), blau = exothermes Ereignis (Kühlen)

4.2.2.5. Charakterisierung von PSM-funktionalisierten Ag_2HgI_4 -Nanopartikeln

Die DLS-Messung von PSM-funktionalisierten Ag_2HgI_4 -Partikeln zeigten einen durchschnittlichen hydrodynamischen Radius von 137 nm. Die Funktionalisierung mit PSM führte zu den größten Partikeln unter den verwendeten Polymeren. Der Polydispersionsindex (PDI) der Partikel lag bei 0,264, was für eine monodisperse Dispersion sprach. Das Zetapotential der Partikel lag bedingt durch den anionischen Charakter des Polymers bei einem Wert von -56 ± 10 mV. Bei diesem Zetapotential waren die Partikel elektrostatisch stabilisiert. Die verwendete PSM-Konzentration lag bei 0,3 mL. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 4.28) zeigten für PSM-funktionalisierte Ag_2HgI_4 -Partikel eine Größe zwischen 150 nm bis 200 nm. Die REM-Aufnahme wurde von aufgereinigten und getrockneten Partikeln aufgenommen.

4. Ergebnisse und Diskussion

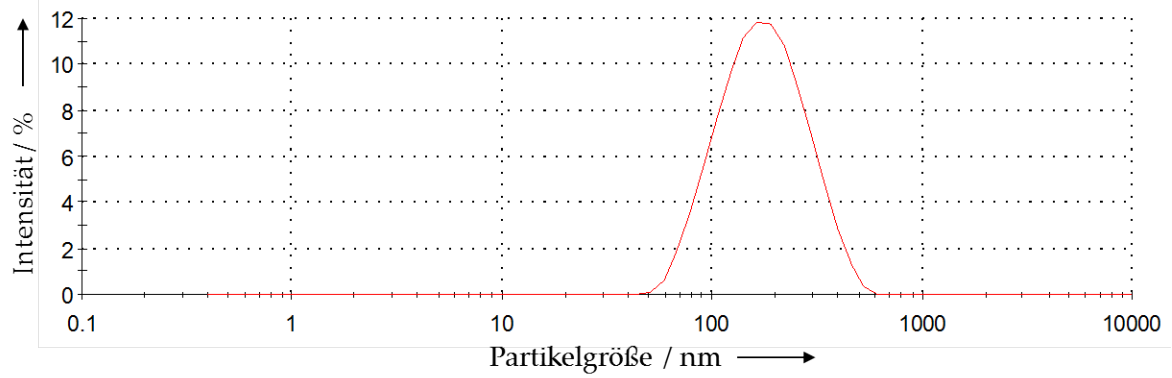


Abbildung 4.26.: DLS-Messung von Ag_2HgI_4 funktionalisiert mit PSM.

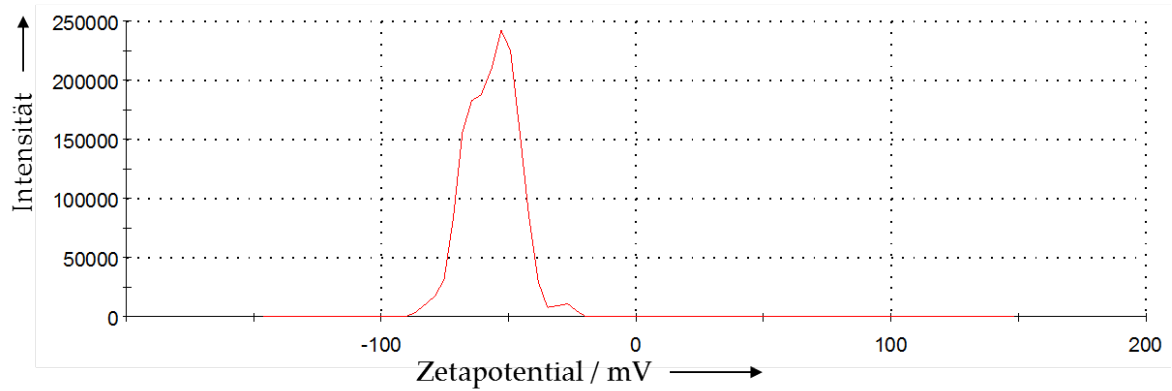


Abbildung 4.27.: Zetapotential-Messung von Ag_2HgI_4 funktionalisiert mit PSM.

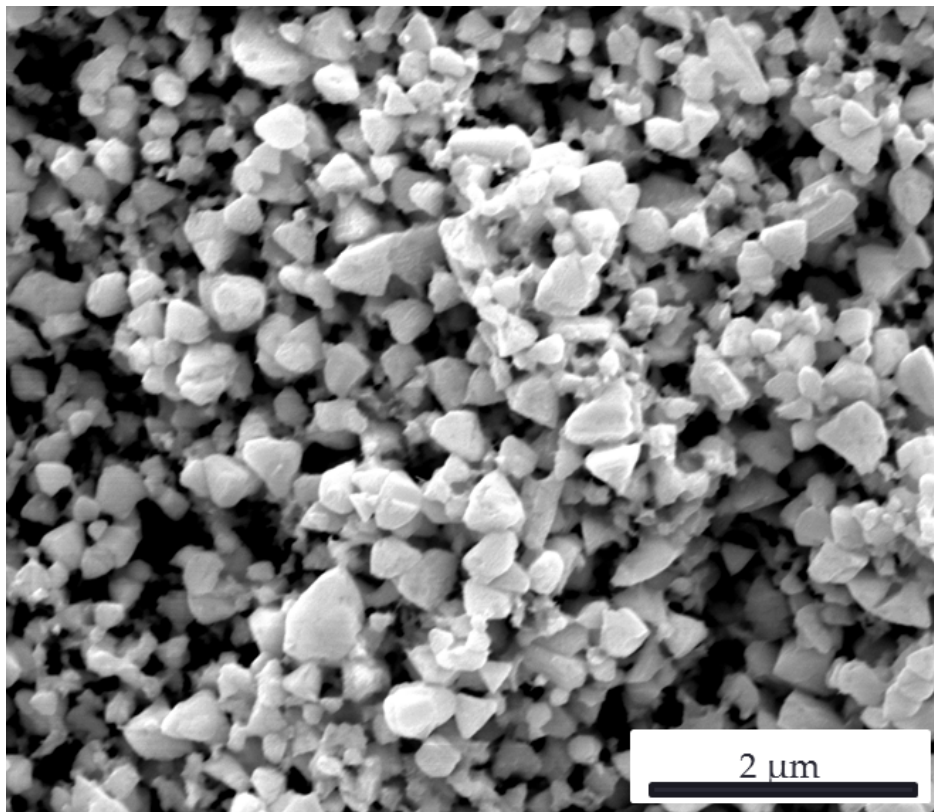


Abbildung 4.28.: REM-Aufnahmen von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PSM.

Die Untersuchung des Farbumschlags wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt. Es wurden Temperaturen von 10 – 70 °C untersucht. Die thermochrome Temperatur lag bei diesen Partikeln zwischen 40 – 50 °C. Die Maxima bei niedrigen Temperaturen waren sehr gut auszumachen. Die Maxima bei 10 – 20 °C waren identisch und lagen bei einer Wellenlänge von 483 nm. Das Maximum bei 30 °C war leicht in Richtung der höheren Wellenlängen verschoben und lag bei 485 nm. Umso näher man der thermochromen Temperatur kam, umso weiter wurde das Absorptionsmaximum in Richtung der höheren Wellenlängen verschoben. Bei 40 °C lag das Maximum bei 487 nm. Alle Messungen ab 50 °C zeigten keine eindeutige Absorption mehr.

4. Ergebnisse und Diskussion

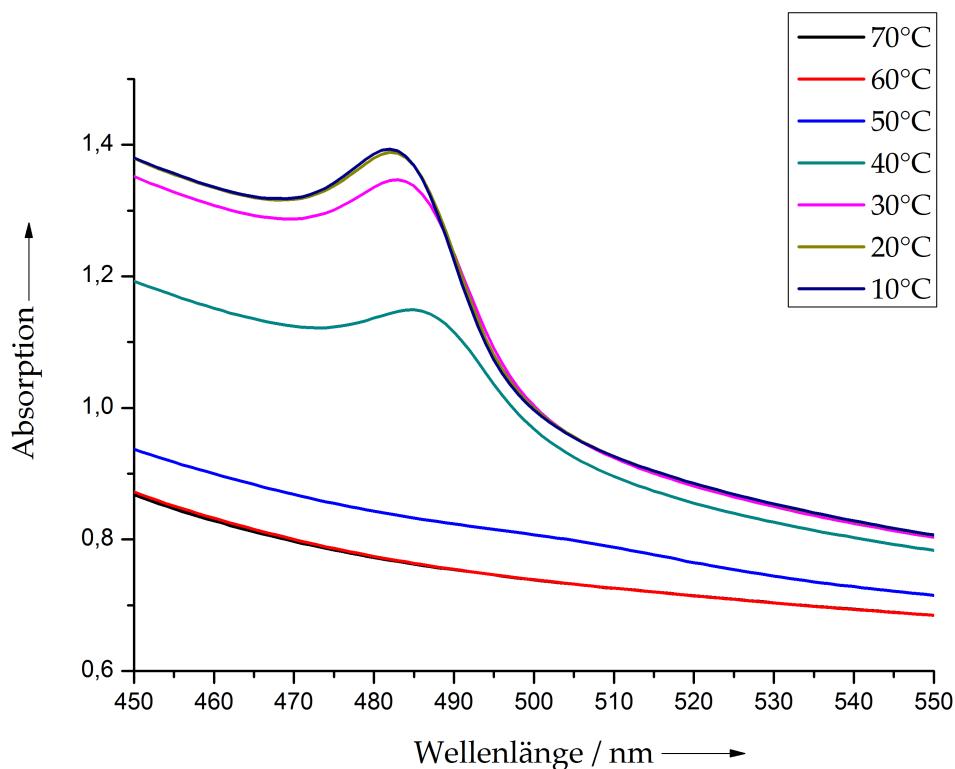


Abbildung 4.29.: UV/Vis-Spektren von Ag_2HgI_4 funktionalisiert mit PSM, bei unterschiedlichen Temperaturen.

Zur weiteren Analyse der Verbindung wurde ein Röntgenpulverdiffraktogramm aufgenommen. Die Verbindung zeigte alle typischen Reflexe für $\beta\text{-Ag}_2\text{HgI}_4$. In Abbildung 4.30 werden die Reflexe der Verbindung dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Verbindung einphasig und ohne Verunreinigungen durch AgI hergestellt werden konnte.

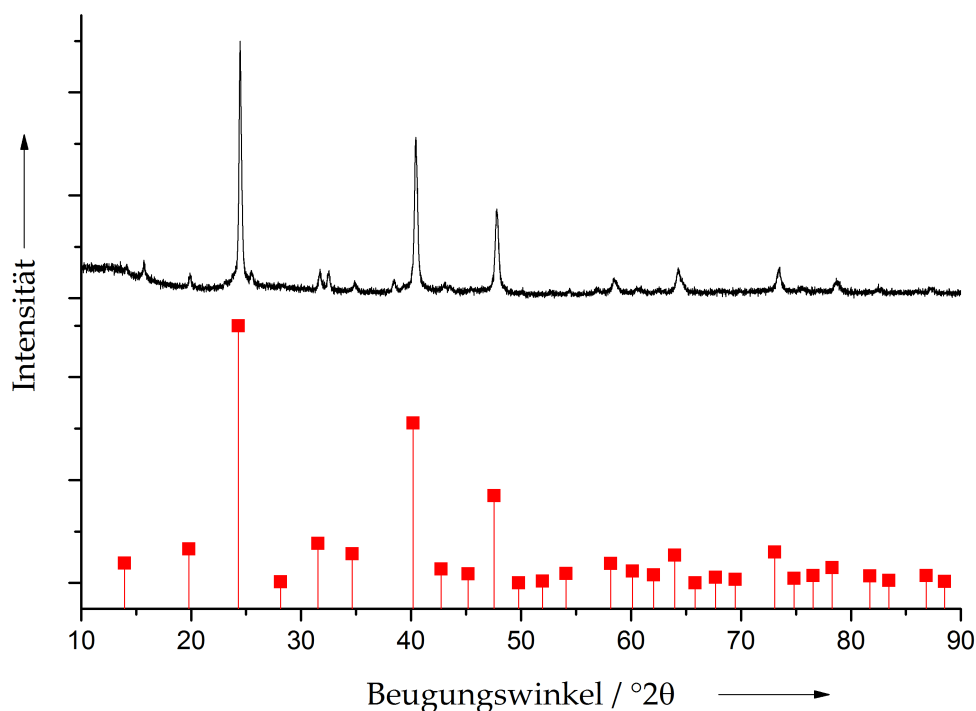


Abbildung 4.30.: XRD-Spektrum von Ag_2HgI_4 mit einer PSM Funktionalisierung. Zum Vergleich sind die Literaturreflexe von $\beta\text{-Ag}_2\text{HgI}_4$ [ICDD 74-0168] aufgeführt (rot).

Die Umwandlungstemperatur wurde mittels DSC-Messung bestimmt. In Abbildung 4.9 ist der Graph der Messung abgebildet. Beim Aufheizen der Probe sah man ein endothermes Ereignis, welches für eine Phasenumwandlung von der β -Phase in die α -Phase spricht. Dieser Übergang war bei einer Temperatur von $50,1\text{ }^\circ\text{C}$ zu beobachten. Das exotherme Ereignis war beim Abkühlen der Probe zu erkennen. Der Phasenübergang war verzögert und fand bei einer Temperatur von $27,2\text{ }^\circ\text{C}$ statt. Die Enthalpie beim Phasenübergang von der β - zur α -Phase betrug $6,4\text{ J g}^{-1}$. Die Enthalpie des Phasenübergangs von der α - zur β -Phase betrug $-5,8\text{ J g}^{-1}$. Eine Phasenumwandlung läuft theoretisch innerhalb von wenigen Sekunden ab, deshalb sollten die Peaks schmal sein. Die beobachteten Peaks waren jedoch relativ breit, was auf eine zu langsame Änderung der Temperatur zurückzuführen war. Die Temperaturerhöhung lief in 5 K min^{-1} ab, diese Temperaturerhöhung verzögerte die Phasenumwandlung (kinetisch), was zu den beobachteten breiteren Peaks führte.

4. Ergebnisse und Diskussion

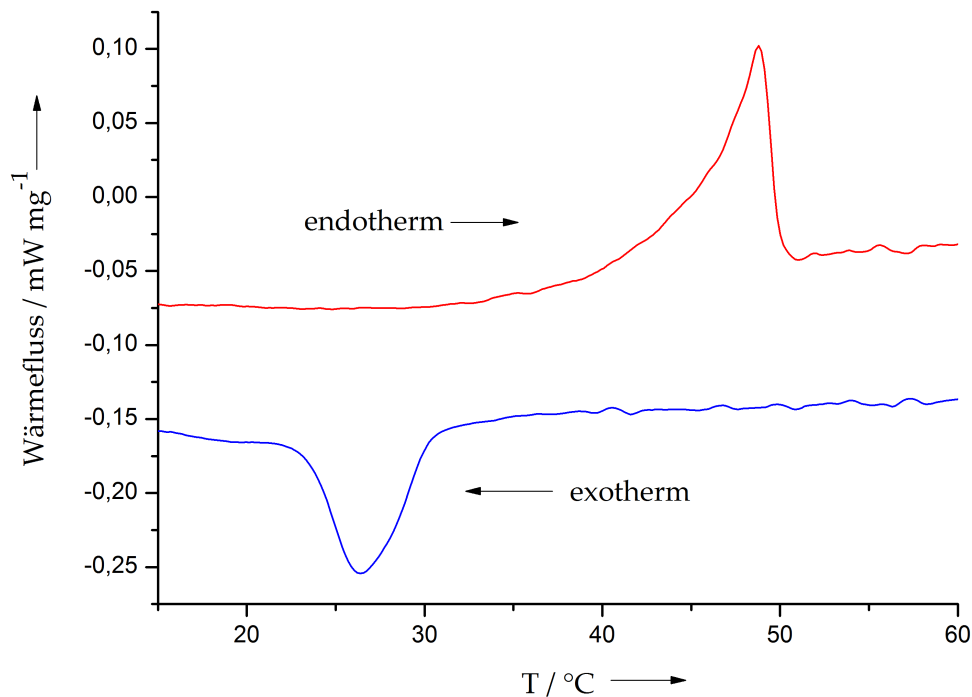


Abbildung 4.31.: Graph der Dynamischen Differenzkalorimetrie von Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PSM. Rot = endothermes Ereignis (Heizen), blau = exothermes Ereignis (Kühlen)

4.2.2.6. Ergebnisse der elektrophoretischen Abscheidung der Ag_2HgI_4 -Nanopartikel

Für die elektrophoretische Abscheidung wurden diejenigen Partikel ausgewählt, die eine hohe Oberflächenladung aufwiesen. Diese Partikel waren durch die Ladung sehr gut geeignet für die elektrophoretische Abscheidung. Für die Abscheidungen wurden die Partikel mit einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} in Isopropanol redispergiert und anschließend bei 50 V abgeschieden. Die Abscheidezeit wurde variiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Abscheidungen mit PAA-, PSS- und PSM-funktionalisierten Ag_2HgI_4 erklärt. Die Abscheidungen mit PAA-funktionalisierten Nanopartikeln ergab eine Schicht aus Partikeln mit einer Größe von 200-500 nm. Die Größe der Partikel veränderte sich während der Abscheidung. Das Ergebnis lässt sich durch die Ostwald-Reifung erklären. Bei dieser wird der Konzentrationsunterschied in einem geschlossenen System ausgeglichen, indem ein

4. Ergebnisse und Diskussion

Materiestrom von den kleinen zu den großen Partikeln fließt. Das heißt, die kleinen Partikel schrumpfen, während die großen weiter an Größe zu nehmen. In Abbildung 4.32 ist eine REM-Aufnahme der Abscheidung auf Silicium dargestellt.

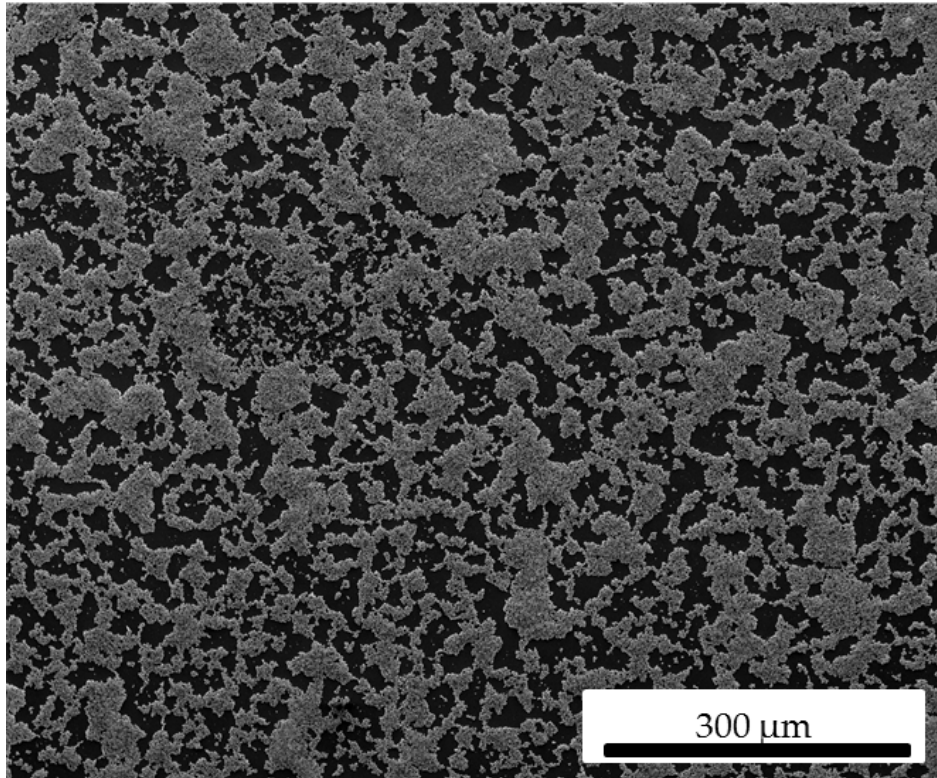


Abbildung 4.32.: REM-Aufnahme von elektrophoretisch abgeschiedenen Ag_2HgI_4 -Nanopartikeln, funktionalisiert mit PAA auf Silicium. Die Abscheidenspannung betrug 50 V, die Abscheidezeit 4 min.

Das gleiche Phänomen der vergrößerten Partikel nach der elektrophoretischen Abscheidung, war bei der Abscheidung von PSM- und PSS-funktionalisierten Partikeln zu beobachten. In Abbildung 4.33 wird eine REM-Aufnahme der Abscheidung mit PSS-funktionalisierten Partikeln dargestellt. Die Partikel besaßen eine Größe zwischen 200 nm bis 400 nm. Was wiederum bedeutete, dass die Partikel sich vergrößerten. Außerdem war zu erkennen, dass die Schicht inhomogen abgeschieden wurde. Die Abscheideparameter betrugen 50 V und die Abscheidezeit 2 min.

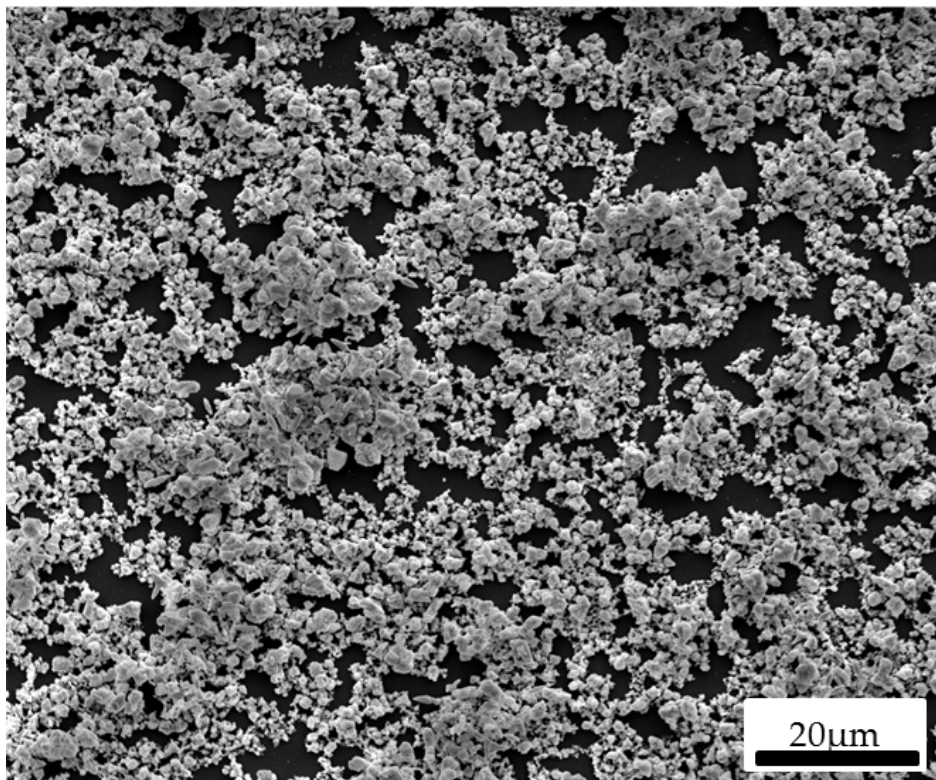


Abbildung 4.33.: REM-Aufnahme von elektrophoretisch abgeschiedenen Ag_2HgI_4 -Nanopartikel, funktionalisiert mit PSS auf Silicium. Die Abscheidspannung betrug 50 V, die Abscheidezeit betrug 2 min.

In Abbildung 4.34 ist die Abscheidung von PSM-funktionalisierten Partikeln dargestellt. Die Größe der Partikel lag wie bei den anderen Abscheidungen bei 200-500 nm. Auch hier kann von einer Ostwald-Reifung der Partikel ausgegangen werden. Die gewählten Abscheidparameter betrugen 50 V und die Abscheidezeit 2 min. Auf der REM-Aufnahme war außerdem zu erkennen, dass die Partikel teilweise kristallisiert waren, was einen Einfluss auf die Größe hatte. Eine Ursache für die Kristallisation konnte jedoch nicht gefunden werden. Die Schicht wurde etwas dichter abgeschieden als bei den anderen funktionalisierten Nanopartikeln.

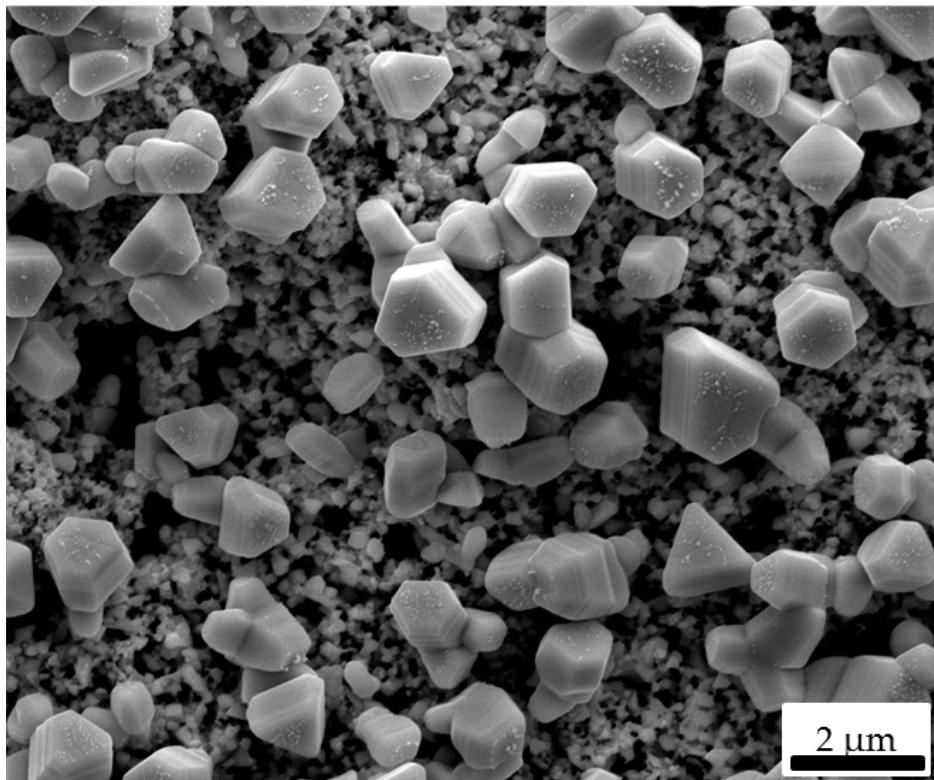


Abbildung 4.34.: REM-Aufnahme von elektrophoretisch abgeschiedenen Ag_2HgI_4 -Nanopartikel, funktionalisiert mit PSM. Die Abscheidespannung betrug 50 V, die Abscheidezeit 2 min.

Als Beispiel für eine elektrisch schaltbare thermochrome Schicht wurde die Abscheidung mit PSM-funktionalisierten Partikeln ausgewählt. Für die Schaltung wurden die Partikel auf Silicium mit den gleichen Abscheideparametern wie oben beschrieben abgeschieden. Abbildung 4.35 a zeigt die gelbe Schicht abgeschiedener Partikel. An diesem Silicium-Substrat wurden Elektroden angebracht, über die der Phasenübergang erfolgen sollte. Nach dem Anlegen einer Spannung von 4,5 V und 0,5 A änderte sich die Farbe von gelb nach orange-rot (Abbildung 4.35 b). Das Experiment zeigte, dass der Phasenübergang bei PSM-funktionalisierten Partikeln von der β - zur α -Phase durch Strom schaltbar ist.

4. Ergebnisse und Diskussion

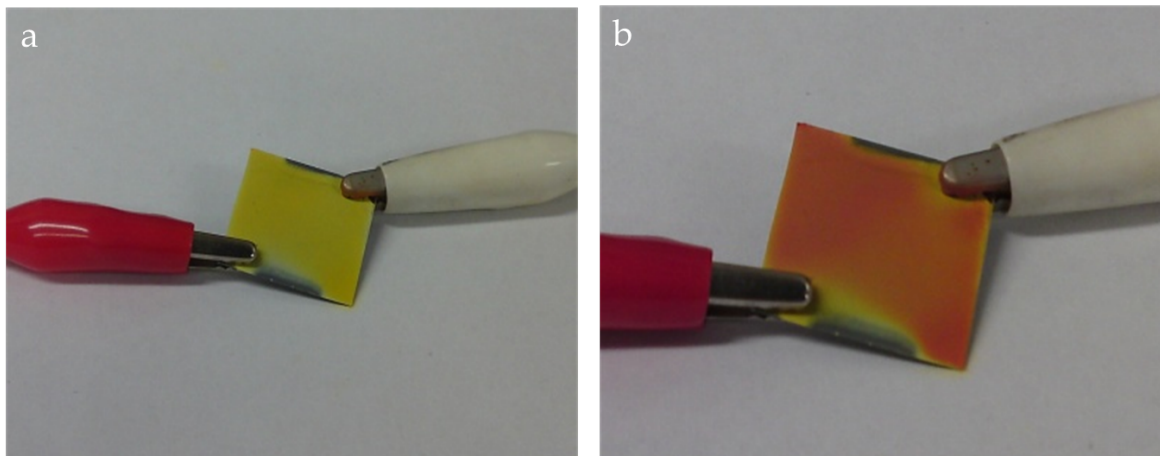


Abbildung 4.35.: Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PSM, elektrophoretisch abgeschieden auf Silicium-Substraten vor und nach anlegen von Spannung, a) 0 V, b) 4,5 V, 0,5 A .

Ein Phasenübergang mittels Temperaturschaltung ist in Abbildung 4.36 dargestellt. Bei Raumtemperatur lag die gelbe β -Phase vor (Abbildung 4.36 a). Die Farbe änderte sich ab einer Temperatur von 40 °C zu orange-rot (Abbildung 4.36 b). Ab dieser Temperatur geht die β -Phase in die α -Phase über und das Substrat nahm eine orange-rote Farbe an.

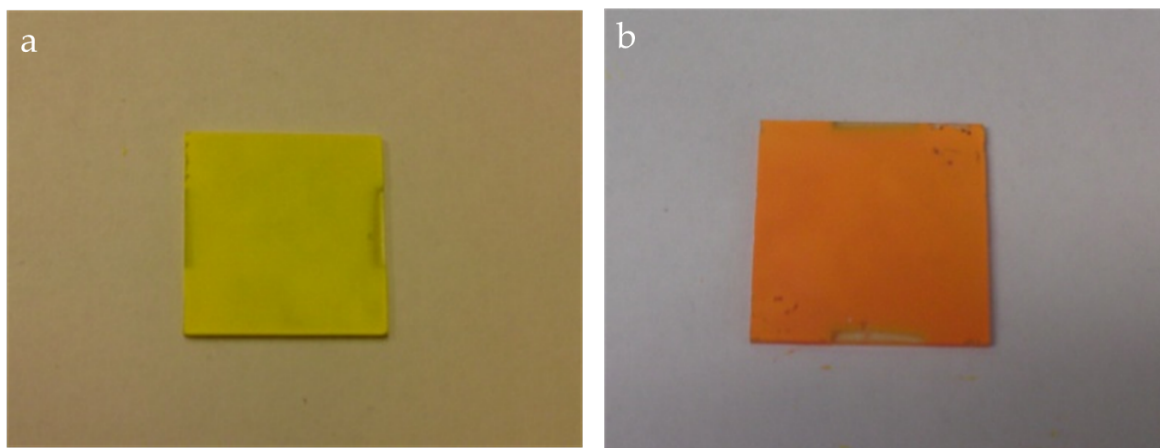


Abbildung 4.36.: Ag_2HgI_4 , funktionalisiert mit PSM, elektrophoretisch abgeschieden auf Indium-Zinnoxid-Substraten bei a) Raumtemperatur und bei b) größer 40 °C.

Abbildung 4.37 gibt den Phasenübergang in einer Dispersion wider. In dieser Abbildung ist der Phasenübergang bei drei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Das

4. Ergebnisse und Diskussion

Experiment zeigte, dass der Phasenübergang bei 40 °C anfang. Ab einer Temperatur von 48 °C war der Phasenübergang abgeschlossen. Die Phasenübergangstemperatur ist gleich mit der, die mittels DSC bestimmt wurde.

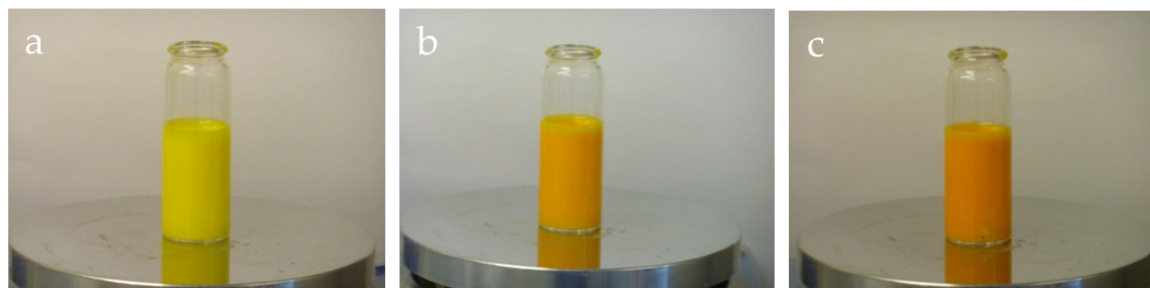


Abbildung 4.37.: Ag_2HgI_4 funktionalisiert mit PSS, nach der Fällung bei a) Raumtemperatur, b) bei 40 °C und c) bei 48 °C.

4.2.3. Synthese und Funktionalisierung von Quecksilberiodid-Nanopartikeln (HgI_2)

Die Synthese von HgI_2 -Nanopartikeln (Rkt. Gl. 4.4) erfolgt analog zur Synthese von Ag_2HgI_4 -Nanopartikeln. Die Fällung der Partikel wird über eine Peristaltikpumpe realisiert. Dabei werden eine 0,04 M Quecksilberchlorid- (HgCl_2)- und eine 0,08 M Kaliumiodid- (KI)-Lösung in ein Becherglas mit vorgelegter Polymerlösung gepumpt. Die Lösungen werden 50 s, bei gleichem Volumenstrom pro Schlauch, in das Becherglas eingeleitet.



Für die Stabilisierung der Partikel werden vier Polymere verwendet (PSS, PAA, PSM und PVP), diese sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Aufarbeitung der Partikel erfolgt mittels Zentrifugation. Die Proben werden jeweils eine Stunde bei 3000 rpm (1109 g) zentrifugiert, dreimal mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

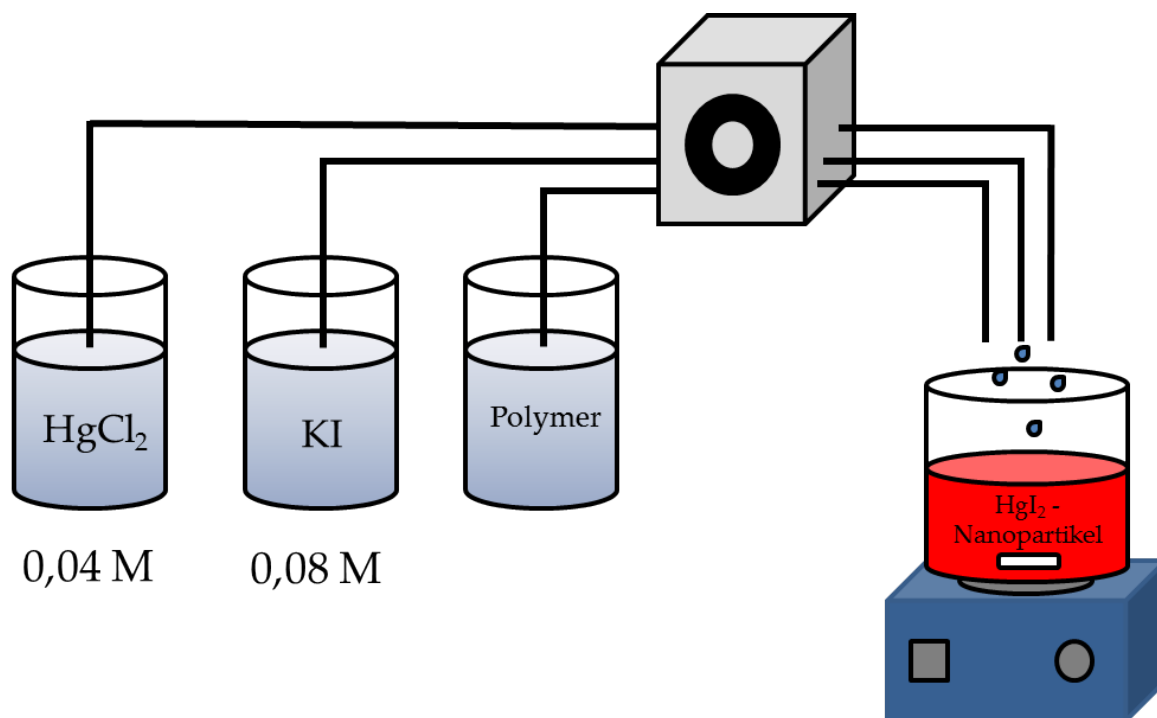


Abbildung 4.38.: Schematische Darstellung der Fällung von Quecksilberiodid-Nanopartikeln (HgI_2).

4.2.4. Charakterisierung von HgI_2 -Nanopartikeln

Die Charakterisierung von HgI_2 -Nanopartikeln stellte sich als schwierig heraus. DLS-Messungen waren mit diesen Nanopartikeln nicht möglich. Die Stabilität der Partikel betrug maximal 30 min, nach dieser Zeit begann die Flockung. Die Größenbestimmung erfolgte deswegen nur mittels REM-Aufnahmen. Die Funktionalisierung erfolgte mit vier Polymeren, die vorher für die Funktionalisierung von Ag_2HgI_4 benutzt wurden. Für die Bestimmung der richtigen Polymermenge wurden Versuche zur Synthese der Partikel mit unterschiedlichen Polymerkonzentrationen durchgeführt.

4.2.4.1. Charakterisierung von PSS-funktionalisierten HgI_2 -Nanopartikeln

In Abbildung 4.39 ist eine REM-Aufnahme dargestellt, welche PSS-funktionalisierte HgI_2 -Nanopartikel zeigt. Die Größe der Partikel betrug 30 nm bis 60 nm. Die Partikel zeigten eine sphärische Morphologie.

4. Ergebnisse und Diskussion

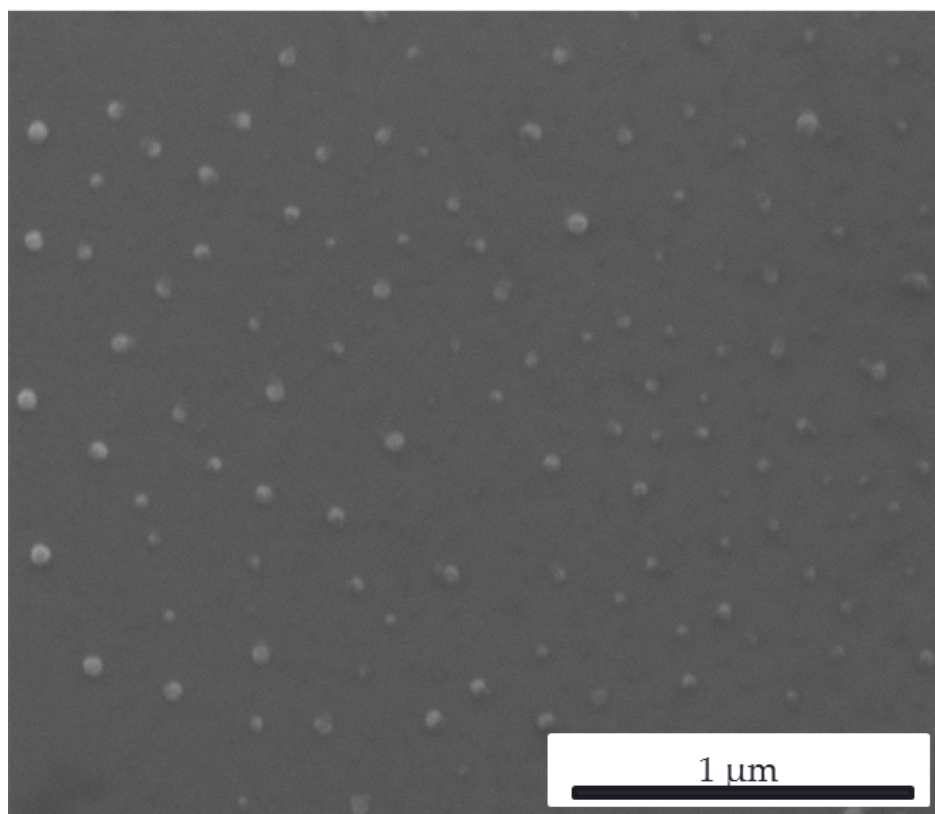


Abbildung 4.39.: REM-Aufnahme von HgI_2 -Nanopartikeln, funktionalisiert mit PSS.

Um Verunreinigungen und Phasenreinheit der Nanopartikel zu überprüfen, wurden XRD-Messungen durchgeführt. In Abbildung 4.40 sind Diffraktogramme von PSS-funktionalisierten HgI_2 -Nanopartikeln dargestellt. Die Partikel wurden mit verschiedenen Polymerkonzentrationen gefällt. Die Diffraktogramme zeigten, dass die Nanopartikel phasenrein bei allen verwendeten Konzentrationen gefällt wurden.

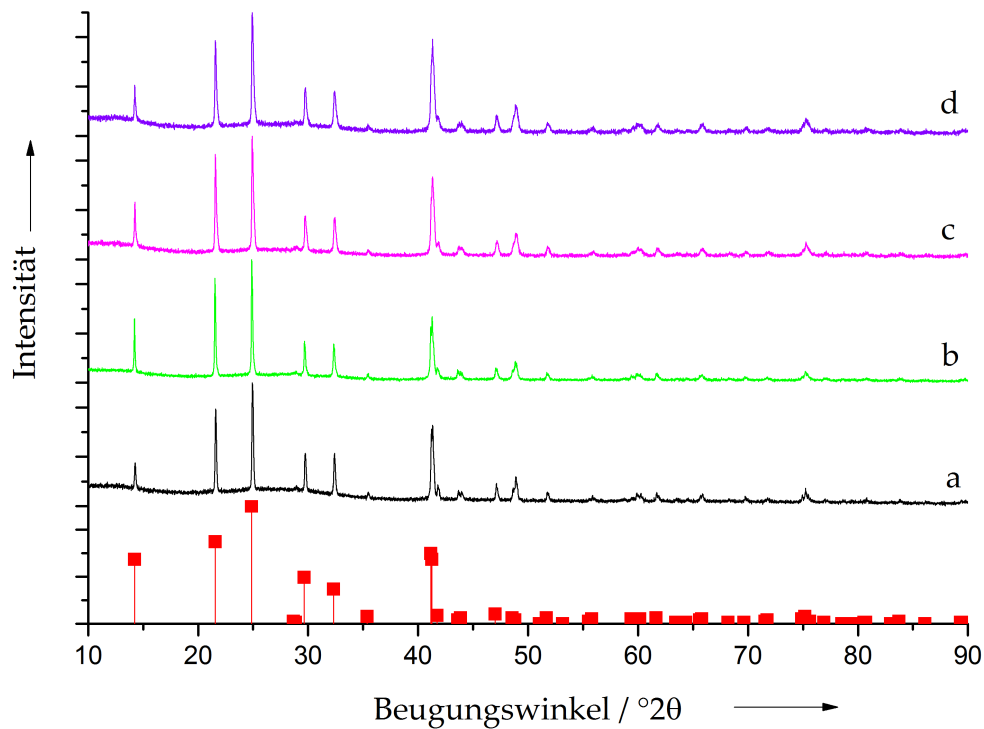


Abbildung 4.40.: Röntgenpulverdiffraktogramm von HgI₂, funktionalisiert mit PSS. a) PSS Konzentration 8 g L⁻¹, b) PSS Konzentration 6 g L⁻¹, c) PSS Konzentration 4 g L⁻¹ und d) PSS Konzentration 2 g L⁻¹. Zum Vergleich sind die Literaturreflexe von α-HgI₂ [ICDD 21-1157] aufgeführt (rot).

HgI₂ besitzt zwei Phasenumwandlungstemperaturen. Bei 127 °C tritt ein Phasenübergang von tetragonalen zu monoklinen Strukturen auf. Bei der Phasenübergangstemperatur von 134,2 °C tritt ein Übergang von tetragonalen zu orthorhombischen Strukturen ein. Daher konnte die Phasenumwandlungstemperatur nur mittels DSC bestimmt werden.^[159] Abbildung 4.41 zeigt einen Graph der Dynamischen Differenzkalorimetrie von reinem HgI₂. Es ist eine Phasenübergangstemperatur von 132,5 °C zu erkennen. Das Ergebnis lässt den Schluss zu, dass der Phasenübergang von der α-Phase (tetragonal) zur β-Phase (orthorhombisch) stattfand. Es konnte nur ein endothermes Ereignis gemessen werden, da die Phasenumwandlung beim Abkühlen gehemmt war. Selbst nach einiger Zeit war es nicht möglich, den Phasenübergang von der β- zur α-Phase mittels DSC zu messen. Die Enthalpie des endothermen Phasenübergangs betrug 6,4 J g⁻¹.

4. Ergebnisse und Diskussion

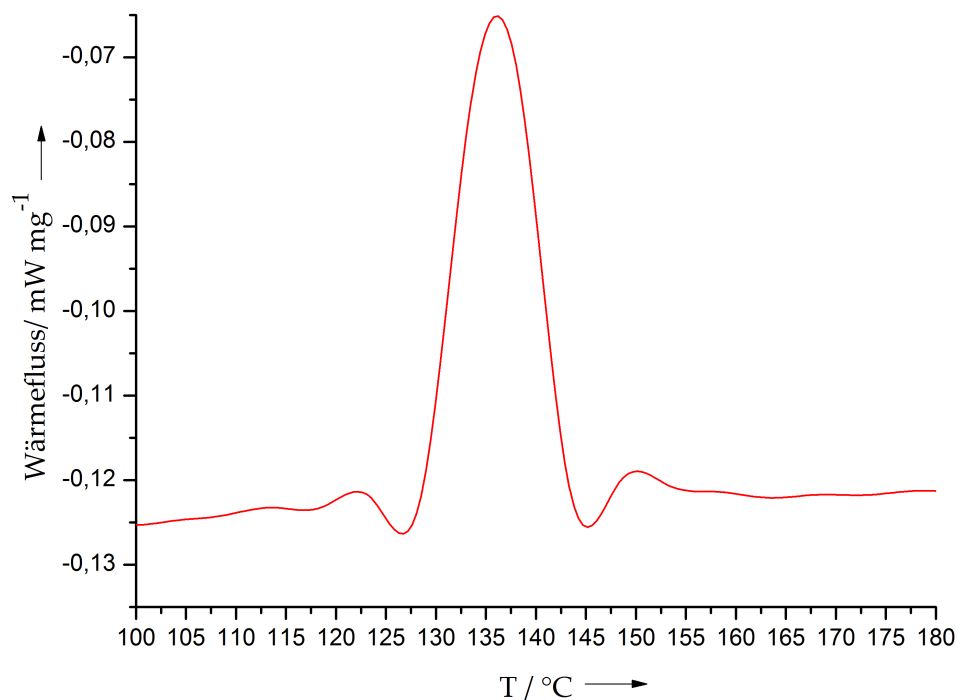


Abbildung 4.41.: Graph der Dynamischen Differenzkalorimetrie von reinem HgI₂.

Nach der Fällung von HgI₂ mit PSS-Funktionalisierung zeigte die DSC-Messung eine *Onset*-Temperatur von 135,1 °C. Die DSC-Kurve wurde von HgI₂ mit einer Polymerkonzentration von 2 g L⁻¹ aufgenommen. Die Enthalpie des Phasenübergangs betrug 5,8 J g⁻¹. Im Vergleich zu reinem HgI₂ verschob sich die Phasenübergangstemperatur nur geringfügig um 3 °C. Es war nicht möglich, den Phasenübergang beim Abkühlen zu messen. Diese DSC-Messung dient als Beispiel für einphasige HgI₂-Nanopartikel.

4. Ergebnisse und Diskussion

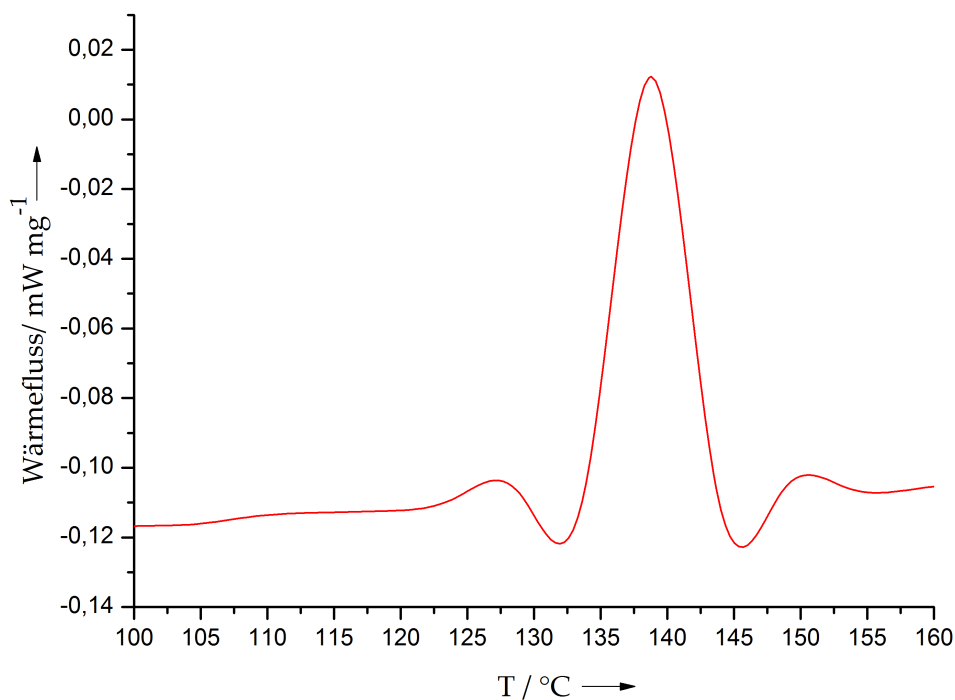


Abbildung 4.42.: Graph der Dynamischen Differenzkalorimetrie von PSS-funktionalisiertem, einphasigen HgI_2 .

4.2.4.2. Charakterisierung von PAA-funktionalisierten HgI_2 -Nanopartikeln

Die Größenbestimmung von PAA-funktionalisierten Nanopartikeln erfolgte mittels REM. Die ermittelte Größe betrug 50 nm bis 90 nm. Die Stabilität der Partikel in Dispersion lag bei 30 min. Die Fällung der Partikel erfolgte mit verschiedenen Polymerkonzentrationen.

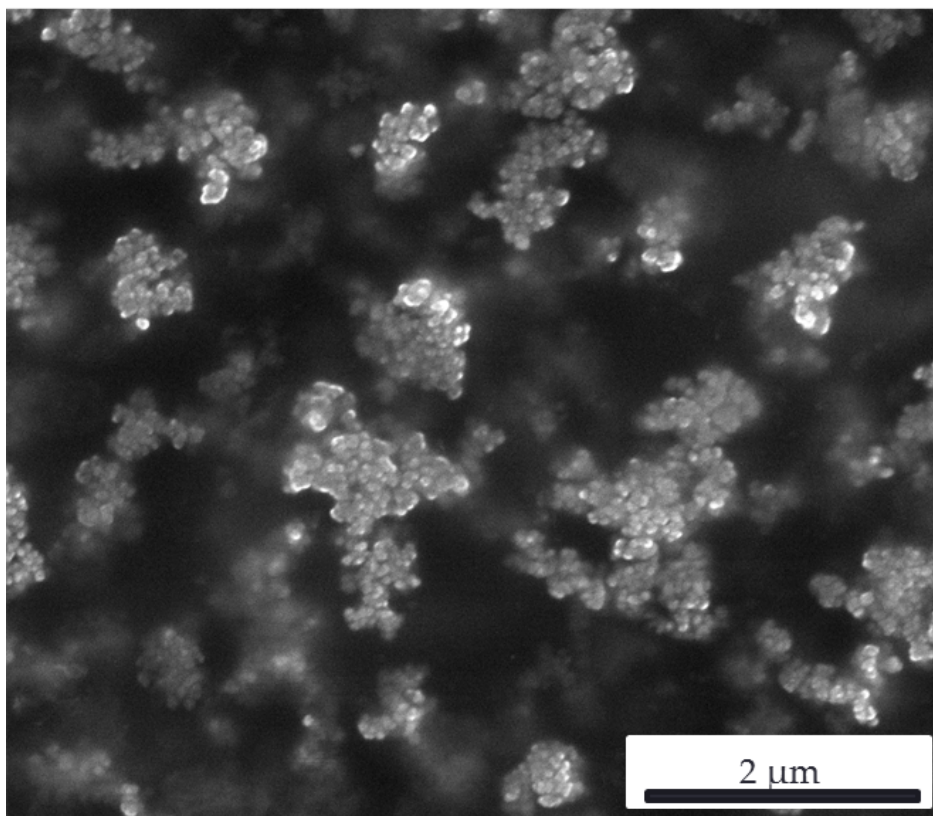


Abbildung 4.43.: REM-Aufnahme von HgI₂-Nanopartikeln, funktionalisiert mit PAA.

Die Untersuchung mittels XRD-Messung zeigte, dass die Reinheit der Phase abhängig von der Polymerkonzentration war. Bei einer Polymerkonzentration von 0,5 g L⁻¹ erhielt man eine reine α -Phase (Abbildung 4.44). Erhöht man die Polymerkonzentration auf 1 g L⁻¹ erhielt man ein zweiphasiges HgI₂. Hierbei lagen die α - und β -Phase nebeneinander vor (Abbildung 4.45).

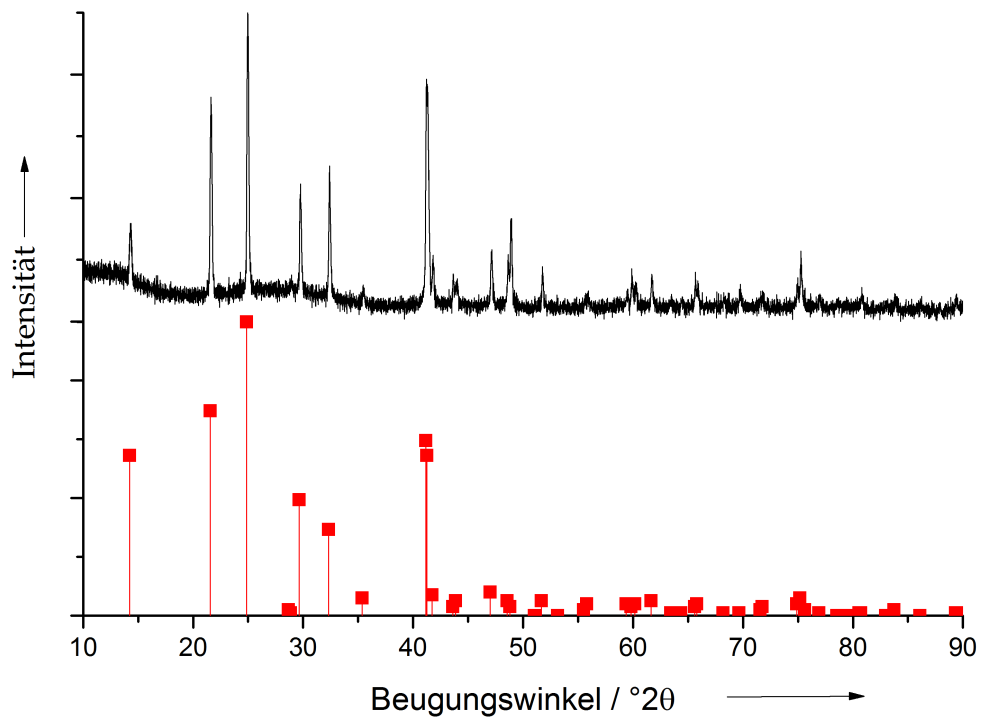


Abbildung 4.44.: Röntgenpulverdiffraktogramm von HgI_2 , funktionalisiert mit $0,5 \text{ g L}^{-1}$ PAA. Zum Vergleich sind die Literaturreflexe von $\alpha\text{-HgI}_2$ [ICDD 21-1157] aufgeführt (rot).

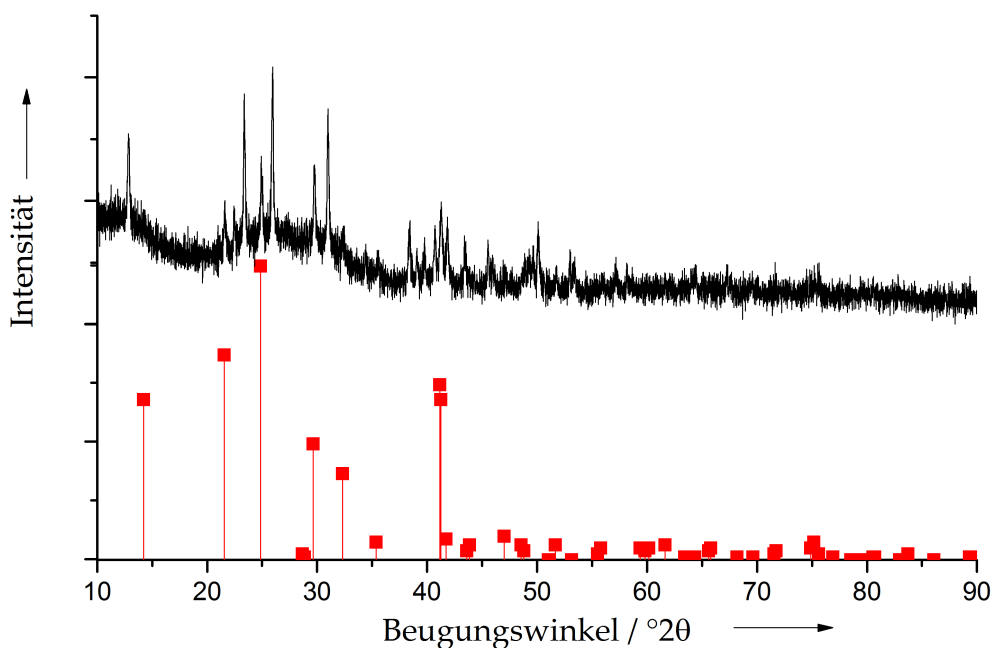


Abbildung 4.45.: Röntgenpulverdiffraktogramm von HgI_2 , funktionalisiert mit 1 g L^{-1} PAA. Zum Vergleich sind die Literaturreflexe von $\alpha\text{-HgI}_2$ [ICDD 21-1157] (rot) und $\beta\text{-HgI}_2$ [ICDD 73-0456] (blau) aufgeführt.

4.2.4.3. Charakterisierung von PSM-funktionalisierten HgI_2 -Nanopartikeln

Die REM-Aufnahmen von PSM-funktionalisierten HgI_2 -Nanopartikeln ergaben Partikelgrößen von 50 nm bis 90 nm. Die Dispersion war für ca. 30 min stabil, danach agglomerierten die Partikel.

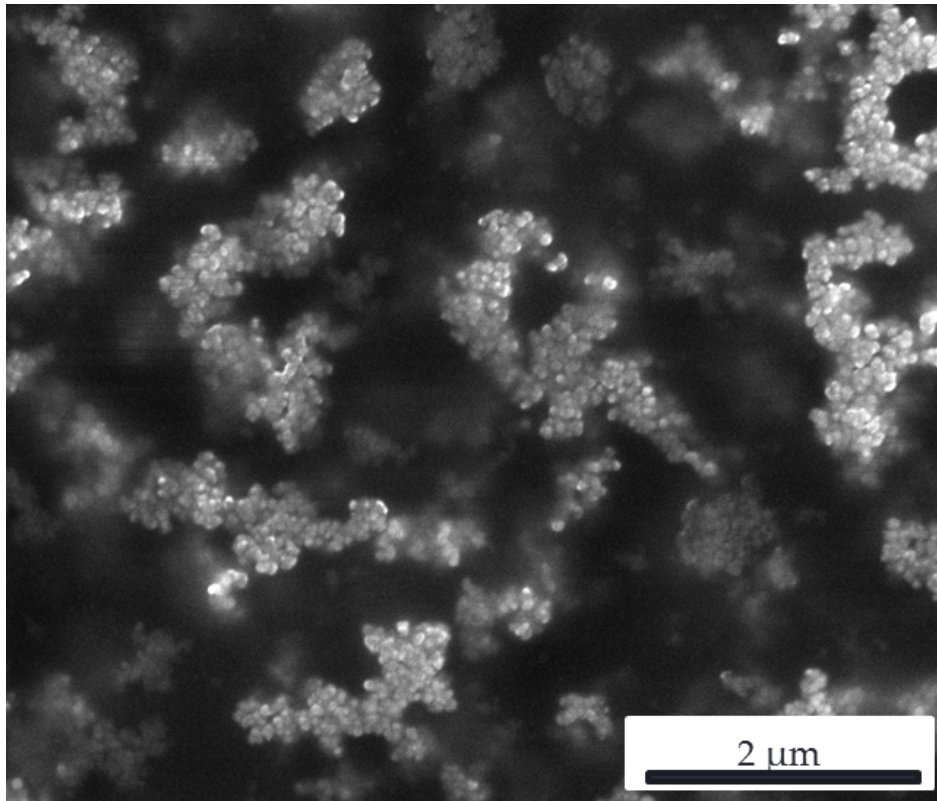


Abbildung 4.46.: REM-Aufnahme von HgI₂-Nanopartikeln, funktionalisiert mit PSM.

Die Partikel wurden mittels XRD untersucht. Es zeigte sich, dass die Partikel immer zweiphasig gefällt wurden. Die Polymerkonzentration hatte keinen Einfluss auf die Phasenreinheit. In Abbildung 4.47 werden die Diffraktogramme der gefällten Nanopartikel gezeigt. In Abbildung 4.48 ist reines HgI₂, als Beispiel für einphasiges HgI₂, dargestellt.

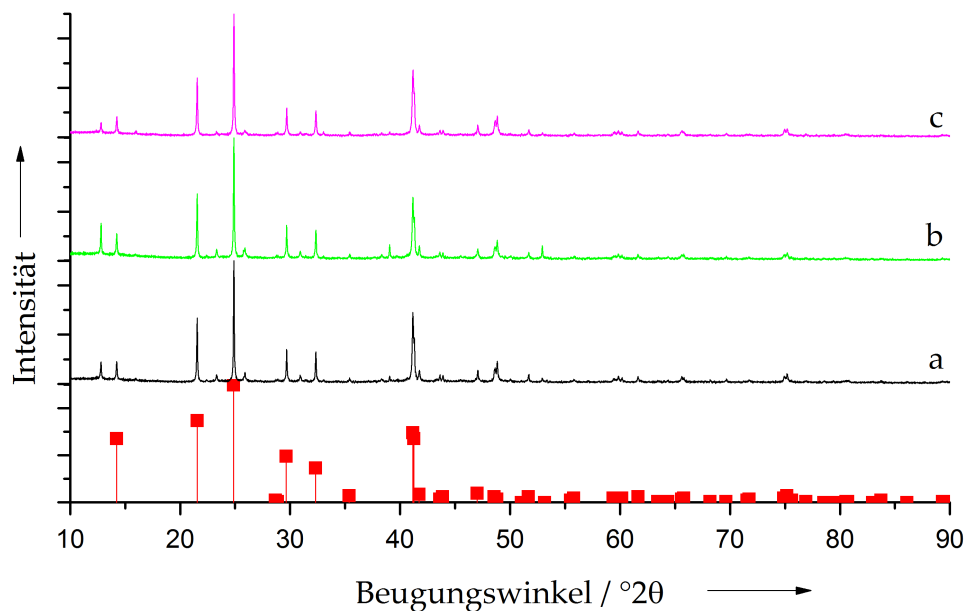


Abbildung 4.47.: Röntgenpulverdiffraktogramm von HgI_2 , funktionalisiert mit PSM. a) PSM Konzentration 0,10 mL, b) PSM Konzentration 0,05 mL, c) PSM Konzentration 0,03 mL. Zum Vergleich sind die Literaturreflexe von $\alpha\text{-HgI}_2$ [ICDD 21-1157] (rot) und $\beta\text{-HgI}_2$ [ICDD 73-0456] (blau) aufgeführt.

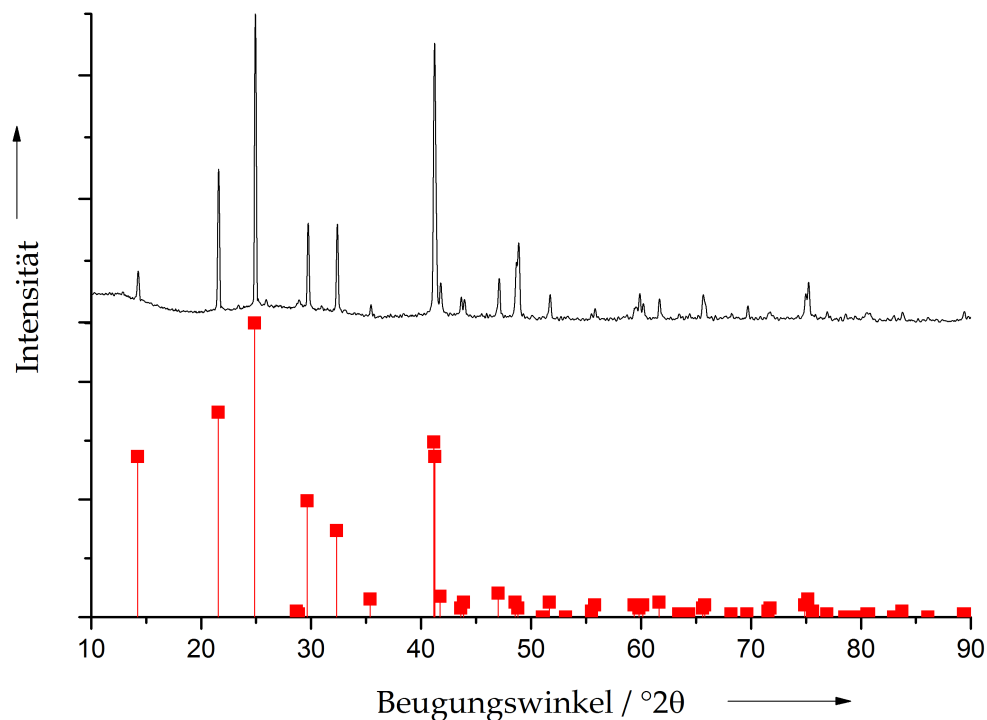


Abbildung 4.48.: Röntgenpulverdiffraktogramm von HgI_2 ohne Funktionalisierung. Zum Vergleich sind die Literaturreflexe von $\alpha\text{-HgI}_2$ [ICDD 21-1157] (rot) aufgeführt.

Die DSC-Messung zeigte den Charakter der zwei Phasen. Im Vergleich zu einphasigem HgI_2 veränderte sich die Breite des Peaks drastisch. Es bildete sich eine Schulter, was auf die zweite Phase hindeutete. Die *Onset*-Temperatur für die Phasenumwandlung betrug $134,9\text{ }^\circ\text{C}$. Die Enthalpie der Umwandlung hatte einen Wert von $3,9\text{ J g}^{-1}$. Der DSC-Graph der Messung ist in Abbildung 4.31 dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

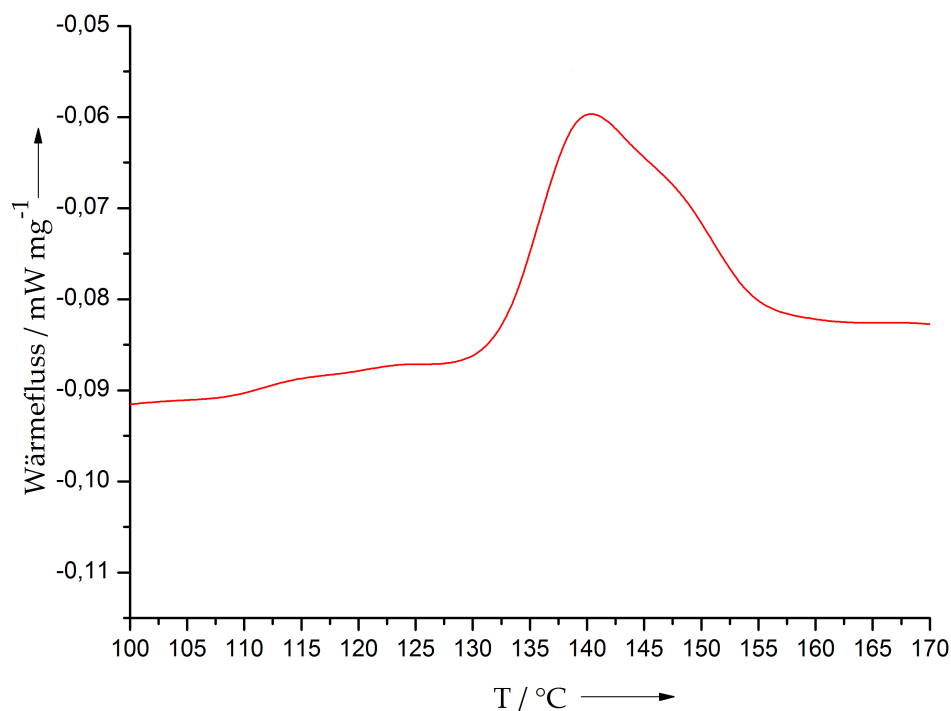


Abbildung 4.49.: Graph der Dynamischen Differenzkalorimetrie von PSM-funktionalisiertem zweiphasigen HgI_2 .

4.2.4.4. Charakterisierung von PVP-funktionalisierten HgI_2 -Nanopartikeln

PVP-funktionalisierte HgI_2 -Nanopartikel zeigten die gleiche Größenverteilung wie die vorher beschriebenen Partikel. Die Größe betrug 50 nm bis 90 nm. Die Stabilität in der Dispersion belief sich auf 40 min. In Abbildung 4.50 ist die REM-Aufnahme der gefällten Nanopartikel gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

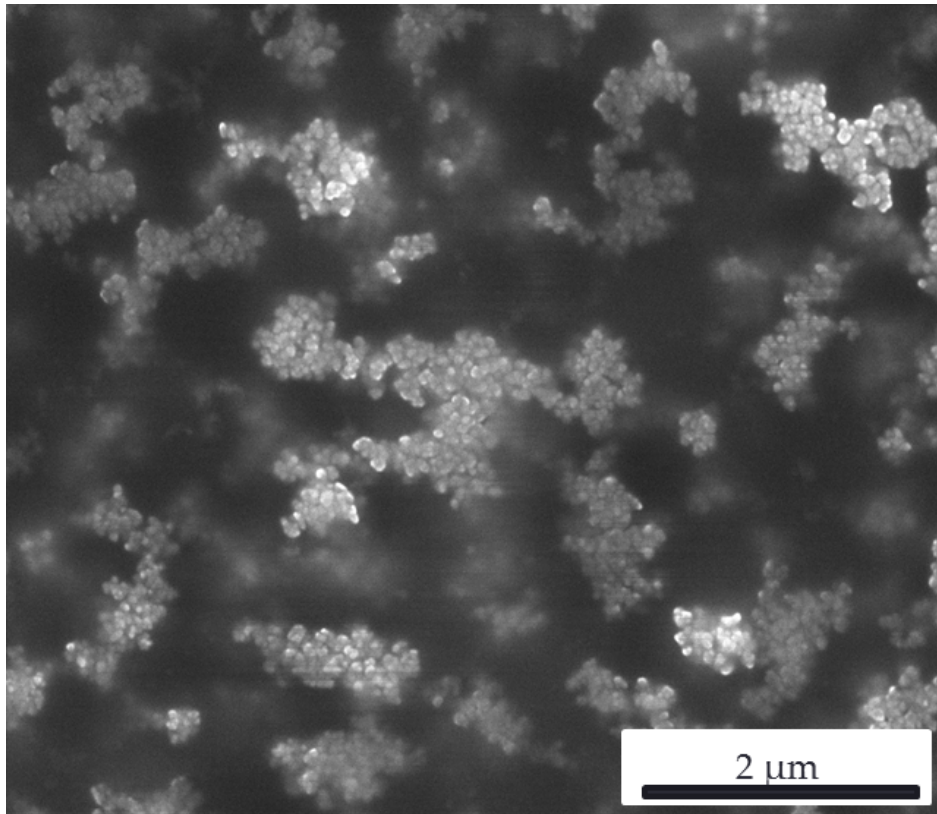


Abbildung 4.50.: REM-Aufnahme von HgI_2 -Nanopartikeln, funktionalisiert mit PVP.

Das Röntgenpulverdiffraktogramm zeigte in diesem Fall eine zweiphasige Synthese der Nanopartikel. Als Beispiel dafür ist ein Diffraktogramm einer Fällung mit einer Polymerkonzentration von 2 g L^{-1} in Abbildung 4.51 gezeigt.

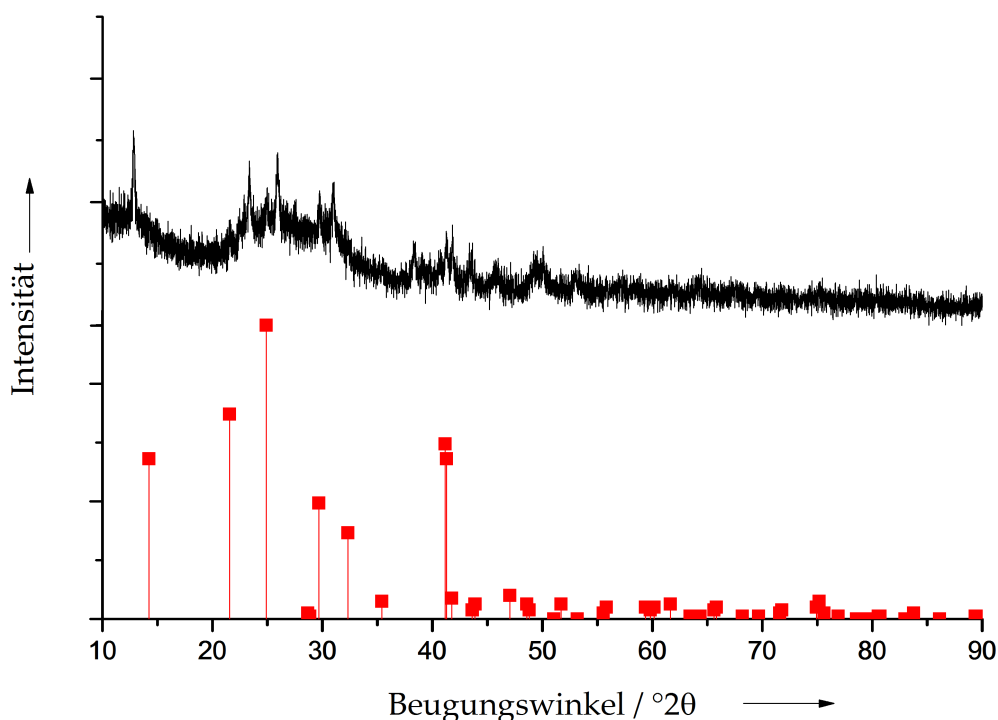


Abbildung 4.51.: Röntgenpulverdiffraktogramm von HgI_2 , funktionalisiert mit 2 g L^{-1} PVP. Zum Vergleich sind die Literaturreflexe von $\alpha\text{-HgI}_2$ [ICDD 21-1157] (rot) und $\beta\text{-HgI}_2$ [ICDD 73-0456] (blau) aufgeführt.

4.2.4.5. Rietveld-Berechnung

Die Zusammensetzung der zweiphasensigen Fällung wurde am Beispiel von PSM-funktionalisierten HgI_2 -Nanopartikel berechnet. Die Berechnungen wurden von Dr. Oleg Prymak durchgeführt. In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der Berechnung aufgeführt. Die α -Phase war dominant bei der Fällung vertreten. Bei unterschiedlichen Polymerkonzentrationen ergaben sich verschiedene α -& β -Phasen Verhältnisse. Die Berechnung zeigte, dass es nicht möglich war, die β -Phase als einzelne Phase zu isolieren. Die geringste α -Phasenkonzentration ergab sich mit einer Polymerkonzentration von 0,2 mL PSM.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.1.: Rietveld Berechnung der Verhältnisse von zweiphasigem HgI_2 funktionalisiert mit verschiedenen PSM Konzentrationen.

HgI_2	Polymerkonzentration [mL]	Verhältnis [%] α / β
rot/gelb	0,03	85/15
rot/gelb	0,05	83/17
rot/gelb	0,1	82/18
rot/gelb	0,2	72/28
rot/gelb	0,4	82/18
rot/gelb	0,6	79/21
rot/gelb	0,8	89/11
rot/gelb	1,0	84/16

4.2.4.6. Elektrophoretische Abscheidung von HgI_2 -Nanopartikeln

Für die elektrophoretische Abscheidung wurden die einphasigen PSS-funktionalisierten Nanopartikel verwendet. Da das Zetapotential der Partikel nicht bestimmt werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass ein Polyanion ein negatives Zetapotential hervorruft. Das Ergebnis der Abscheidung wird in Abbildung 4.52 gezeigt. In diesem Fall wurde keine Schicht aus Nanopartikeln abgeschieden. Es wurden nur vereinzelt Partikel abgeschieden, die Inseln ausbildeten. Eine Phasenumwandlung wäre bei HgI_2 nur kurz zu sehen (ab 127 °C), da es nach der Umwandlung sofort sublimieren würde.

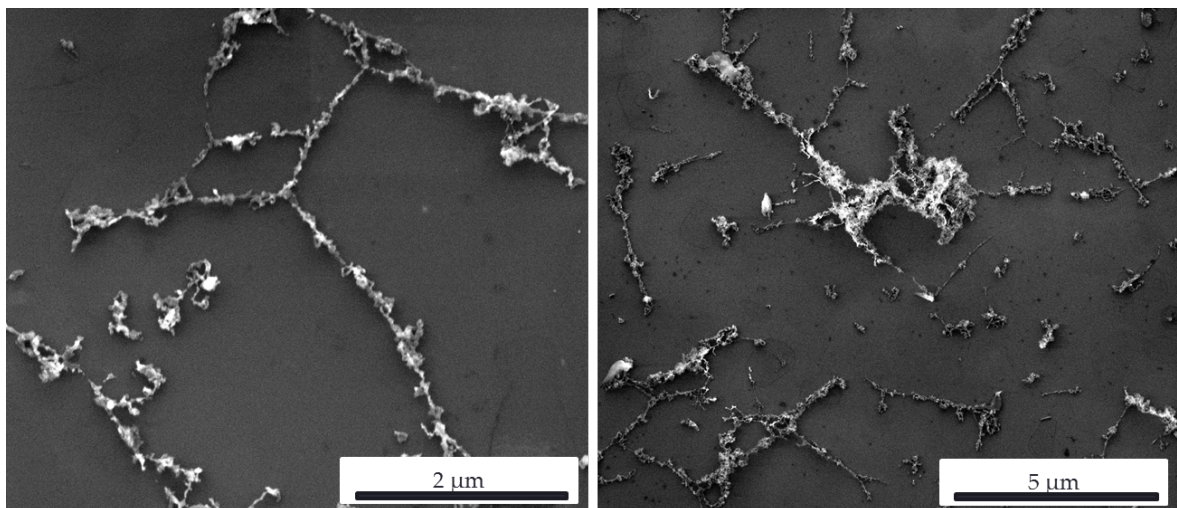


Abbildung 4.52.: REM-Aufnahme einer elektrophoretischen Abscheidung von HgI_2 -Nanopartikeln, funktionalisiert mit PSS.

4.2.4.7. Zusammenfassung

Die Herstellung von Ag_2HgI_4 -Nanopartikeln war möglich. Mit verschiedenen Polymeren waren unterschiedliche Größen herstellbar. DLS-Messungen zeigten Partikel im Größenbereich von 67 nm bis 140 nm. Das Zetapotential zeigte entsprechend dem Charakter der verwendeten Polymere die erwarteten Ergebnisse. In der folgenden Tabelle 4.2 sind die Untersuchungsergebnisse der Nanopartikel aufgeführt.

Tabelle 4.2.: Zusammenfassung der Untersuchungen an Ag_2HgI_4 .

Polymer	DLS [nm]	Zetapotential [mV]	REM [nm]	UV (40°C) [nm]	DSC [°C]	Enthalpie [J g ⁻¹]
PAA	96	-85,9 ± 21,2	130-350	490	50,7	7,6
PAH	67	61,1 ± 12	130-400	487	–	–
PVP	68	-21,6 ± 19,2	40-110	500	42,7	1,7
PSS	97	-62,5 ± 17,9	10-300	495	48,2	8,7
PSM	137	-56,2 ± 10,2	150-200	487	50,1	6,4

Mittels DSC-Messungen konnte die thermochrome Temperatur für vier der fünf funktionalisierten Partikel bestimmt werden. Die Partikel mit der PAH-Funktionalisierung wurden nicht mittels DSC vermessen. Die thermochrome Temperatur lag bei etwa 50 °C für drei der vier untersuchten Proben (PAA, PSS, PSM). Die Funktionalisierung mit PVP zeigte jedoch eine thermochrome Temperatur von 42,7 °C und damit eine, 7 °C tiefere thermochrome Temperatur. Daraus kann geschlossen werden, dass die Größe der Partikel Einfluss auf die *Onset*-Temperatur hat. Die größeren Partikel haben eine höhere *Onset*-Temperatur, mit abnehmender Partikelgröße wird die Umwandlungstemperatur kleiner. Die gemessenen Enthalpien zeigten auch hier einen ähnlichen Trend. Die Enthalpien der größeren Partikel sind erheblich höher als bei den kleinen Partikeln, funktionalisiert mit PVP.

Die UV/Vis-Spektren zeigten für alle untersuchten Systeme ähnliche Ergebnisse. Die thermochrome Temperatur ist identisch mit der gemessenen *Onset*-Temperatur. Die durch DSC-Messungen ermittelt wurden. In Tabelle 4.2 sind die Wellenlängen bei einer Temperatur von 40 °C aufgelistet. Ab dieser Temperatur fing die Phasenumwandlung von der β - zur α -Phase an.

Die elektrophoretische Abscheidung von Ag_2HgI_4 - Nanopartikeln funktionierte wie erwartet. Die Schichten waren jedoch nicht vollständig homogen, sie zeigten teilweise Inseln aus Nanopartikeln. Es war möglich, diese Nanopartikel auf Si- und ITO-Substraten abzuscheiden. Die Farbe der Schichten deckte sich gut mit der Farbe der

4. Ergebnisse und Diskussion

Partikel in Dispersion. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Phasenumwandlung mittels Temperaturänderung schalten ließ, des Weiteren ist diese Schaltung auch mittels Stromfluss (*Joule'sche Wärme*) reversibel möglich.

Für HgI₂-Nanopartikel zeigte sich ein etwas anderes Bild. Die Größenbestimmung mittels DLS war hier nicht möglich. Außerdem konnte kein Zetapotential bestimmt werden. Die Größenbestimmung erfolgte ausschließlich durch REM-Aufnahmen. In Tabelle 4.3 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefasst.

Tabelle 4.3.: Zusammenfassung der Untersuchungen an HgI₂.

Polymer	REM [nm]	XRD	DSC [°C]	Enthalpie [J g ⁻¹]
PAA	50-90	einphasig (0,5 g L ⁻¹), zweiphasig (ab 1 g L ⁻¹)	–	–
PVP	50-90	zweiphasig	–	–
PSS	30-60	einphasig	135,1 °C	5,8
PSM	50-90	zweiphasig	134,9 °C	3,9

Die REM-Aufnahmen zeigten für alle Partikel eine einheitliche Größenverteilung. Die kleinsten Partikel konnten mit einer PSS-Funktionalisierung hergestellt werden. Eine Phase (α -Phase) zu fällen, war nicht mit jedem Partikeltyp möglich. Mit den vier untersuchten Polymeren konnten nur mit zwei Polymeren einphasige Partikel hergestellt werden (PAH, PSS). Bei PAH-funktionalisierten Partikeln war die Polymerkonzentration entscheidend für die Phasenreinheit. Mit PSS konnten mit verschiedenen Polymerkonzentrationen einphasige Partikel synthetisiert werden. Mit PVP und PSM war dies jedoch nicht möglich. Es wurden DSC-Messungen für einphasige (PSS) und zweiphasige (PSM) Partikel durchgeführt. Dabei zeigte sich für einphasige Partikel eine erhöhte Phasenumwandlungstemperatur im Vergleich zu reinem HgI₂.

Die Enthalpien für reines und funktionalisiertes HgI₂ waren fast identisch. Die Phasenumwandlungstemperatur von zweiphasigen Partikeln war vergleichbar mit der einphasiger Partikel, jedoch mit einem Unterschied in der Breite der gemessenen Peaks. Bei zweiphasigen Partikeln zeigte sich eine Schulter, welche eine zweite Phase darstellte. Um die Zusammensetzung der zweiphasigen Partikel zu ermitteln, wurden Rietveld-Berechnungen durchgeführt. Diese zeigten, dass es nicht möglich ist, eine der zwei Phasen zu isolieren. Die Versuche, HgI₂-Nanopartikel elektrophoretisch abzuscheiden, zeigten kein positives Ergebnis. Die REM-Aufnahmen zeigten

4. Ergebnisse und Diskussion

keine vollständige Schicht an Nanopartikeln nach der Abscheidung. Eine Phasenumwandlung von einer abgeschiedenen Schicht konnte nicht beobachtet werden.

4.3. Synthese und Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln

Biokompatible Nanopartikel werden in vielen medizinischen Bereichen eingesetzt. Durch ihre Verwendung werden schädigende Einflüsse vermieden. Es besteht großes Interesse an einer genetischen Manipulation von lebenden Zellen zur Behandlung von genetisch bedingten Krankheiten (Gentherapie). Mit diesen Partikeln können z.B. Untersuchungen in Bezug auf die Behandlung von genetisch bedingten Krankheiten durchgeführt werden. Da Biomoleküle im Allgemeinen nicht durch die Lipiddoppelschicht einer Zelle dringen können, werden Nanopartikel als *Carrier* verwendet.^[160] Ein Vorteil von Calciumphosphat-Nanopartikeln ist die leichte Herstellung, die geringe Toxizität und ihre Unempfindlichkeit gegen mikrobiellen Abbau. Sie können sehr gut von Zellen aufgenommen werden und lassen sich gut lagern.

In diesem Abschnitt werden die Synthese und Funktionalisierung der verwendeten Calciumphosphat-Nanopartikel dargestellt. Diese Partikel wurden mit Polymer, Polymer-Fluoreszenzfarbstoffen und Biomolekülen funktionalisiert.

4.3.1. Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit Polyethylenimin (PEI)

Die Synthese von Calciumphosphat-Nanopartikeln erfolgt über einen halbkontinuierlichen Prozess. Eine 18 mM Calcium-*L*-lactat-Lösung und eine 10,8 mM *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung werden mit einer verdünnten Ammoniak-Lösung auf einen pH-Wert von 9 eingestellt.

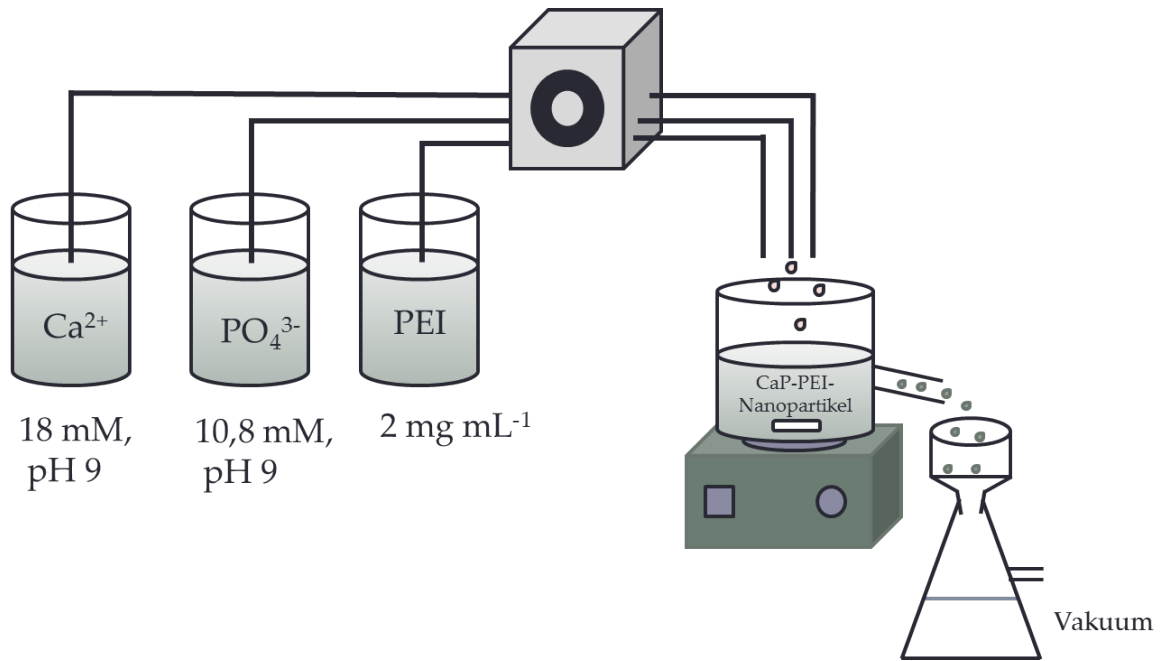


Abbildung 4.53.: Schematische Darstellung der Fällung von Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Die Stabilisierung der Partikel erfolgt mittels einer Funktionalisierung mit einer Polyethylenimin (PEI)-Lösung der Konzentration 2 g L⁻¹. Die Funktionalisierung der Nanopartikel erfolgt direkt bei der Entstehung der Partikel. Alle drei Lösungen werden mit einer Peristaltikpumpe in einen Dreihalskolben mit Überlauf gepumpt. Der Volumenstrom pro Schlauch wird so eingestellt, dass ein Verhältnis von 1 (Ca^{2+}): 1 (PO_4^{3-}): 2 (PEI) entsteht. Über den Überlauf fließt die Dispersion in einen Büchnertrichter und die Partikel werden über einen Filter mit 100 nm Porengröße abfiltriert (Abbildung 4.53). Anschließend werden die Partikel mit Wasser gewaschen und lyophilisiert. Durch die Funktionalisierung mit PEI erhalten die Partikel eine hohe Oberflächenladung und sind deshalb gut für die elektrophoretische Abscheidung geeignet.

4.3.2. Calciumphosphat-Nanopartikel aus einer Wasservorlage

Die Darstellung der Calciumphosphat-Nanopartikel aus einer Wasservorlage ist ähnlich der Synthese von Calciumphosphat-Nanopartikeln. Es werden dabei eine 18 mM Calcium-*L*-lactat-Lösung und eine 10,8 mM *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung mit einer verdünnten Ammoniak-Lösung

4. Ergebnisse und Diskussion

auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Die Stabilisierung der Partikel erfolgt über eine PEI-Lösung der Konzentration 2 g L^{-1} . Die Lösungen werden mit einer Peristaltikpumpe, mit einem Volumenstrom von 5 mL min^{-1} (Ca^{2+} , PO_4^{3-}) und 7 mL min^{-1} (PEI) pro Schlauch, in ein Becherglas mit einer Wasservorlage von 20 mL gepumpt. Nach einer Minute werden die Pumpen abgestellt und die Dispersion wird weitere 20 Minuten gerührt. Die Partikel werden ohne eine weitere Aufreinigung verwendet.

4.3.3. In Wasser redispergierbare Calciumphosphat-Nanopartikel

Für die Herstellung von Calciumphosphat-Nanopartikeln, die in Wasser redispergierbar sind, wird eine 6 mM Calcium-*L*-lactat-Lösung und eine 3,6 mM *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung mit einem pH-Wert von 9 benötigt. Diese beiden Lösungen werden mit einem Volumenstrom von 25 mL min^{-1} pro Schlauch mit einer Peristaltikpumpe in einen Schlauch mit einer Länge von 50 mm gepumpt und zur Keimbildung gebracht. Am Ende des Schlauches wird eine PEI-Lösung mit einer Konzentration von 2 g L^{-1} mit einem Volumenstrom von $12,5 \text{ mL min}^{-1}$ zugepumpt, um die Partikel zu stabilisieren. Die Dispersion wird in einem Becherglas aufgefangen. Anschließend wird ein Volumen von 10 mL - 40 mL entnommen, bei 3000 rpm (1109 g) 20 min zentrifugiert, abdekantiert und in 5 mL Wasser mit einer Sonotrode (30 s, Amplitude 50 %, Pulse 0,8) redispergiert.

4.3.4. Calciumphosphat-Nanopartikel mit Fluoreszenzfarbstoffen

Bei dieser Synthese werden die Nanopartikel mit PEI-FITC- (Fluoresceinisothiocyanat) oder PEI-TRITC- (Tetramethylrhodamin-5-(und 6)-isothiocyanat) funktionalisiert. Das fluoreszierende PEI wird mit einer Standard-Lösung PEI 2 g L^{-1} in verschiedenen Verhältnissen gemischt (1:3,5, 1:5, 1:10). Eine 18 mM Calcium-*L*-lactat-Lösung und eine 10,8 mM *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung, jeweils mit einem pH-Wert von 9, werden mit einer Peristaltikpumpe in ein Becherglas gepumpt. Gleichzeitig wird über eine andere Peristaltikpumpe fluoreszierendes PEI zugepumpt. Der Volumenstrom pro Schlauch wird, wie

bei der Herstellung von Calciumphosphat-Nanopartikel beschrieben, eingestellt. Anschließend wird die Lösung 1 h bei 3500 rpm (1509 g) zentrifugiert, mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet.

4.3.5. Biofunktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Um Calciumphosphat-Nanopartikel zu biofunktionalisieren, wurden verschiedene Desoxyribonukleinsäuren (DNA) verwendet. Es wurde folgende DNA verwendet: Heringssperma DNA > 50 Basenpaaren, Heringssperma DNA < 50 Basenpaaren und *Enhanced Green Fluorescent Protein*- (EGFP)-DNA. Die DNA Konzentration in der Stammlösung beträgt 1 mg mL^{-1} . Es werden gefriergetrocknete Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol mit einer Konzentration von 2 mg mL^{-1} redispergiert und anschließend in einem Verhältnis von 1:1 mit Wasser verdünnt. Anschließend werden Lösungen hergestellt, mit Heringssperma DNA > 50 Basenpaaren und Heringssperma DNA < 50 Basenpaaren, mit einer DNA-Konzentration von $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ und $15 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Um in Ethanol redispergierte Calciumphosphat-Nanopartikel mit EGFP-DNA zu funktionalisieren wird, ein Ethanol zu Wasser Verhältnis von 2:3 hergestellt und eine DNA-Konzentration von $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in der Lösung eingestellt.

Eine weitere Möglichkeit ist die Biofunktionalisierung von in Wasser redispergierten (4.3.3) und nicht aufgereinigten Calciumphosphat-Nanopartikeln (4.3.2), hierbei werden die Partikel-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen ($75 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ und $15 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) von EGFP-DNA versetzt.

4.3.6. Charakterisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln

Im Abschnitt 4.3 wurde die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Calciumphosphat-Nanopartikel beschrieben. Für die elektrophoretischen Abscheidungen ist es wichtig, bestimmte Parameter der verwendeten Partikel zu kennen. Mittels DLS-Messungen wurden die Größe und das Zetapotential der Partikel bestimmt. Partikel, die eine hohe Ladung besitzen, lassen sich elektrophoretisch abscheiden. Zur Stabilisierung der Partikel wurde für alle verwendeten Partikel PEI verwendet.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.3.6.1. Charakterisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln, funktionalisiert mit PEI

Die DLS-Messung, dargestellt in Abbildung 4.54, zeigte, dass die mit PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Partikel einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 150 nm besitzen. Der Polydispersitätsindex (PDI) ist ein Maß für die Breite der Verteilung und lag mit einem Wert von 0,098 in einem Bereich, der auf eine monodisperse Dispersion hinwies. Das gemessene Zetapotential (Abbildung 4.55) zeigte einen Wert von + 29 mV. Dieser Wert zeigte, dass die Partikel eine gute elektrostatische Stabilität aufwiesen und somit sehr gut für die elektrophoretische Abscheidung geeignet waren.

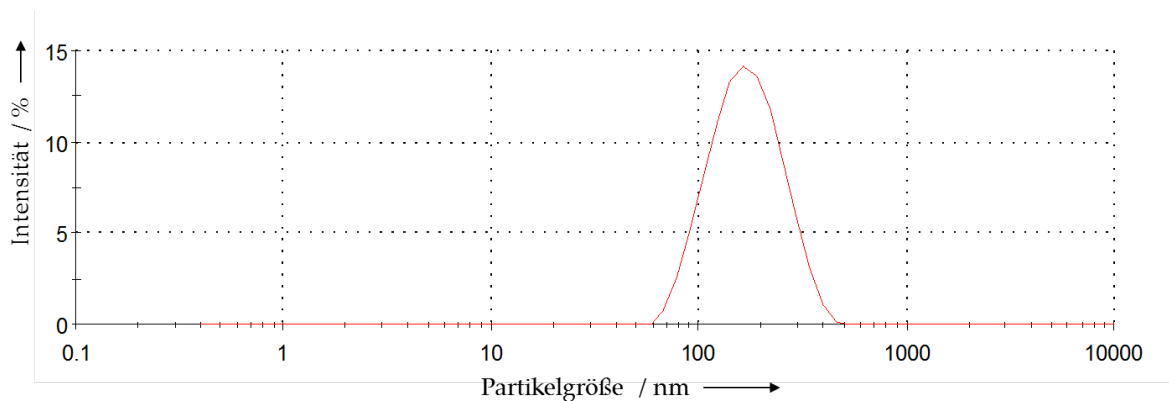


Abbildung 4.54.: DLS-Messung von Calciumphosphat-Nanopartikeln in Wasser.

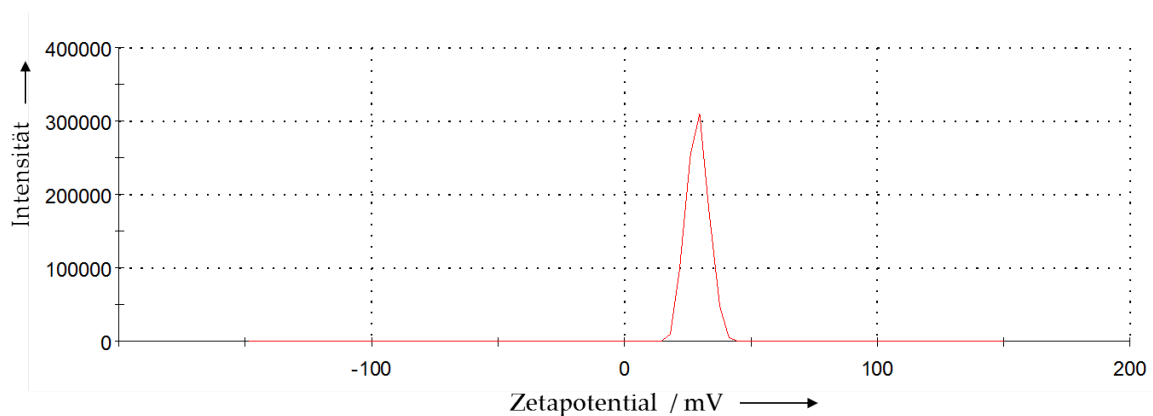


Abbildung 4.55.: Gemessenes Zetapotential von Calciumphosphat-Nanopartikeln in Wasser.

4. Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 4.56 wird eine REM-Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln wiedergegeben. Die Partikel wiesen eine sphärische Morphologie auf. Der durchschnittliche Durchmesser der Partikel lag bei 75 nm bis 120 nm. Im Vergleich mit den DLS-Messungen stimmen die Durchmesser der Partikel gut überein.

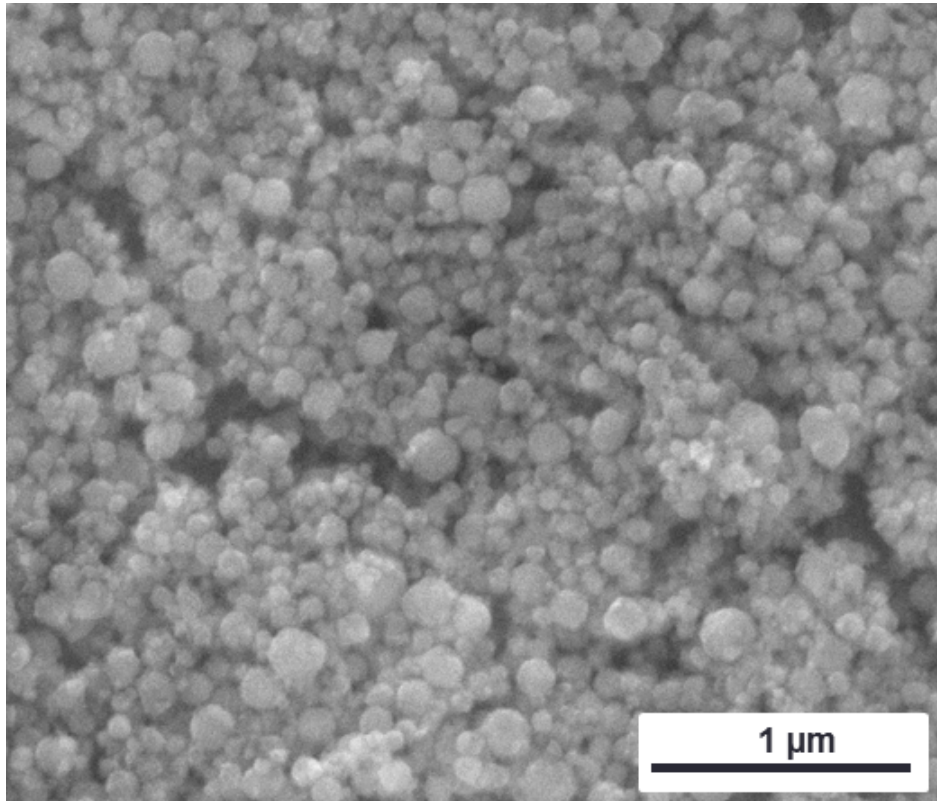


Abbildung 4.56.: REM-Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Die ermittelten Daten von Calciumphosphat-Nanopartikeln gelten auch für Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit Fluoreszenzfarbstoffen funktionalisiert wurden.

4. Ergebnisse und Diskussion

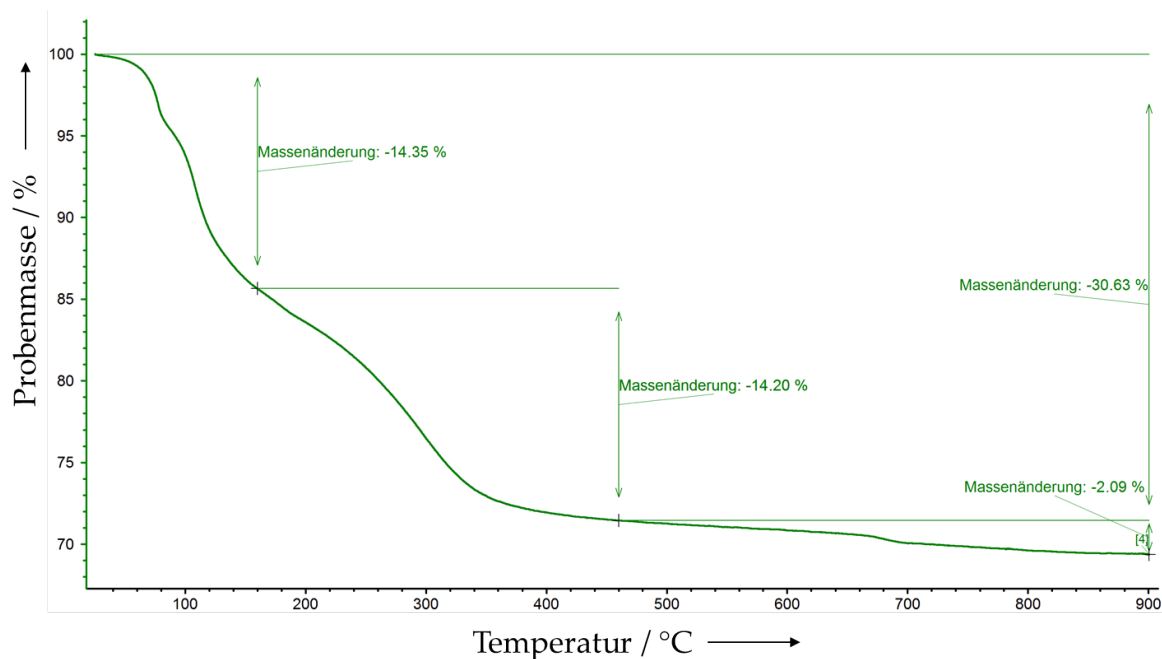


Abbildung 4.57.: Thermogramm der PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel, gemessen in einer Sauerstoffatmosphäre (50 mL min^{-1}) mit einer Heizrate von 2 K min^{-1} .

Mittels thermogravimetrischer Analyse wurden die Massenverluste während des Aufheizens gemessen. In Abbildung 4.57 sind diese Massenverluste von PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln gezeigt. Die Messung wurde in einem Temperaturbereich von $30 - 900 \text{ °C}$ durchgeführt. Es zeigten sich drei Stufen des Massenverlustes. Die erste Stufe lag in einem Temperaturbereich von $30 - 160 \text{ °C}$. Der ermittelte Massenverlust lag bei 14,35 Gew.-%. Dieser Massenverlust wurde auf eingelagertes Wasser in den Partikeln zurückgeführt. Die nächste Stufe beschrieb die Verbrennung des Polymers. Der Temperaturbereich lag bei $160 - 460 \text{ °C}$. Der Massenverlust betrug 14,20 Gew.-%. Im Temperaturbereich von $460 - 900 \text{ °C}$ ist der letzte Massenverlust zu beobachten. Die Massenänderung beträgt 2,09 Gew.-%. Die letzte Stufe beschreibt die Freisetzung von CO_2 . Insgesamt wurde ein Massenverlust von 30,63 Gew.-% gemessen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.3.6.2. Charakterisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln hergestellt aus einer Wasservorlage

Die Charakterisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln, hergestellt aus einer Wasservorlage, zeigte mit DLS-Messungen einen hydrodynamischen Radius von 154 nm (Abbildung 4.58). Das Zetapotential zeigte eine elektrostatische Stabilität der Partikel, der Wert lag bei + 25 mV (Abbildung 4.59). Die Dispersion hatte einen monodispersen Charakter (PDI = 0,131).

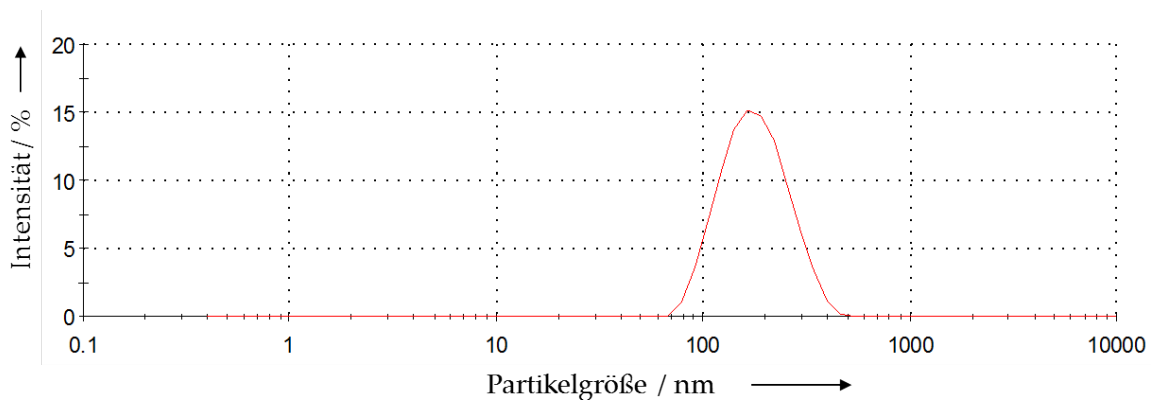


Abbildung 4.58.: DLS-Messung von Calciumphosphat-Nanopartikeln in Wasser, hergestellt aus einer Wasservorlage.

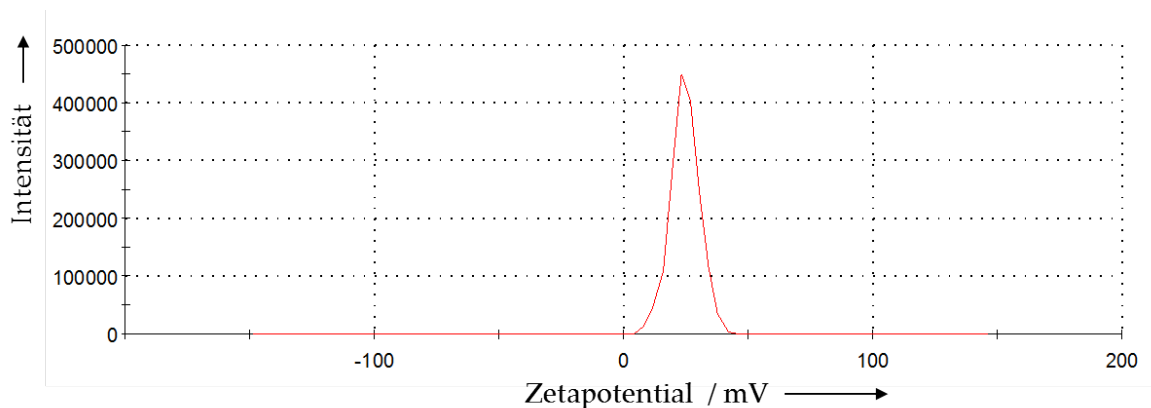


Abbildung 4.59.: Gemessenes Zetapotential von Calciumphosphat-Nanopartikeln in Wasser, hergestellt aus einer Wasservorlage.

Abbildung 4.60 zeigt eine REM-Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln hergestellt aus einer Wasservorlage. Die Größe der Partikel ließ sich auf 75 nm bis 125 nm bestimmen. Die Morphologie der Partikel war sphärisch. Die Größe der

4. Ergebnisse und Diskussion

Partikel war geringer als bei der Bestimmung mittels DLS. Eine Erklärung dafür ist, dass bei DLS-Messungen der hydrodynamische Radius bestimmt wird, die REM-Aufnahmen aber nur den anorganischen Kern zeigen.

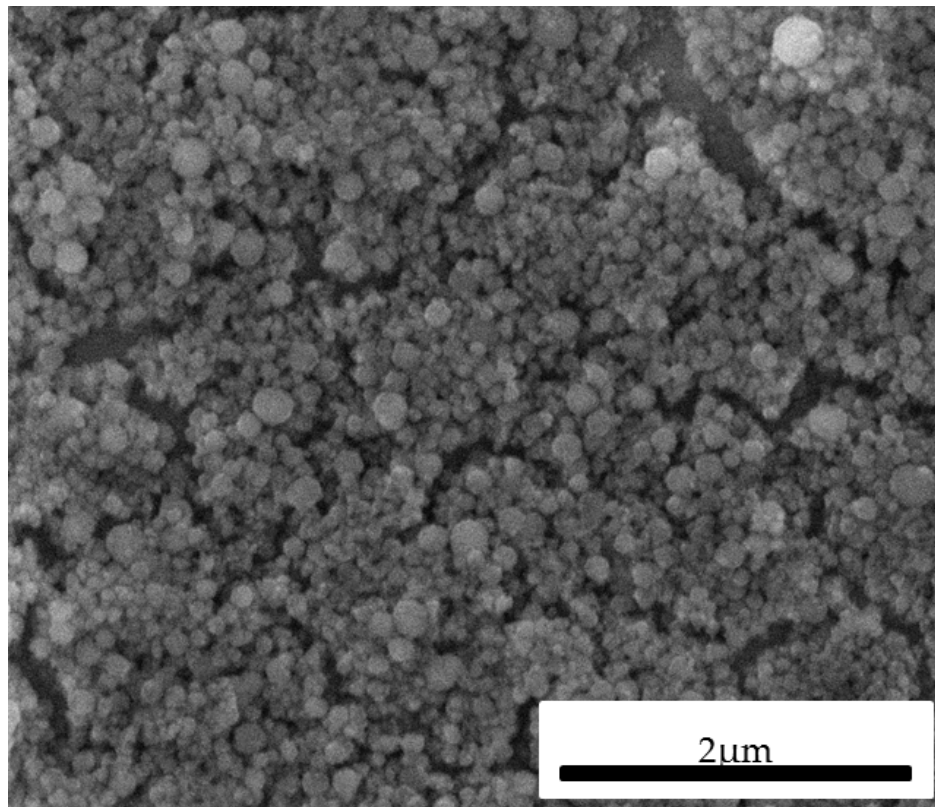


Abbildung 4.60.: REM-Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln, hergestellt aus einer Wasservorlage.

4.3.6.3. Charakterisierung von in Wasser redispergierbaren Calciumphosphat-Nanopartikeln

DLS-Messungen von in Wasser redispergierten Calciumphosphat-Nanopartikeln zeigten eine durchschnittliche Größe von 195 nm (Abbildung 4.61). Der PDI der Dispersion betrug 0,152, das sprach für eine monodisperse Dispersion. Das Zetapotential zeigte einen Wert von + 30 mV (Abbildung 4.62). Die Partikel waren elektrostatisch stabilisiert und gut für die elektrophoretische Abscheidung geeignet.

4. Ergebnisse und Diskussion

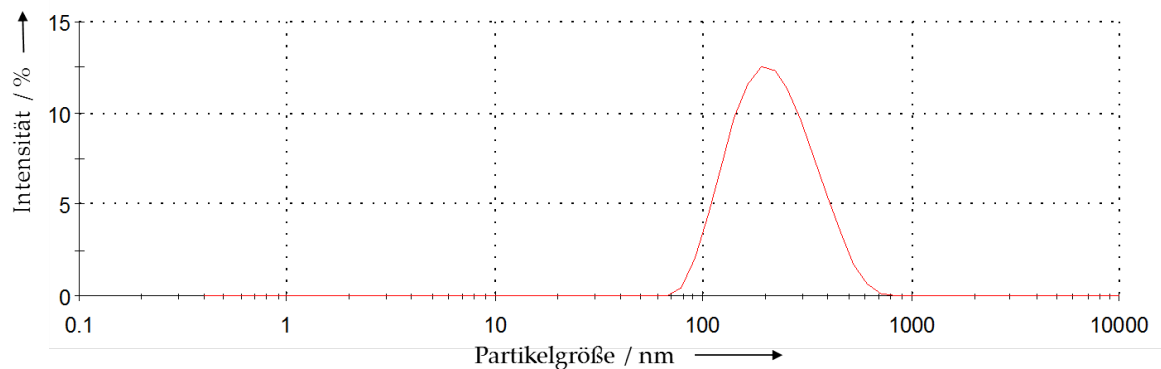


Abbildung 4.61.: DLS-Messung von in Wasser redispergierbaren Calciumphosphat-Nanopartikeln.

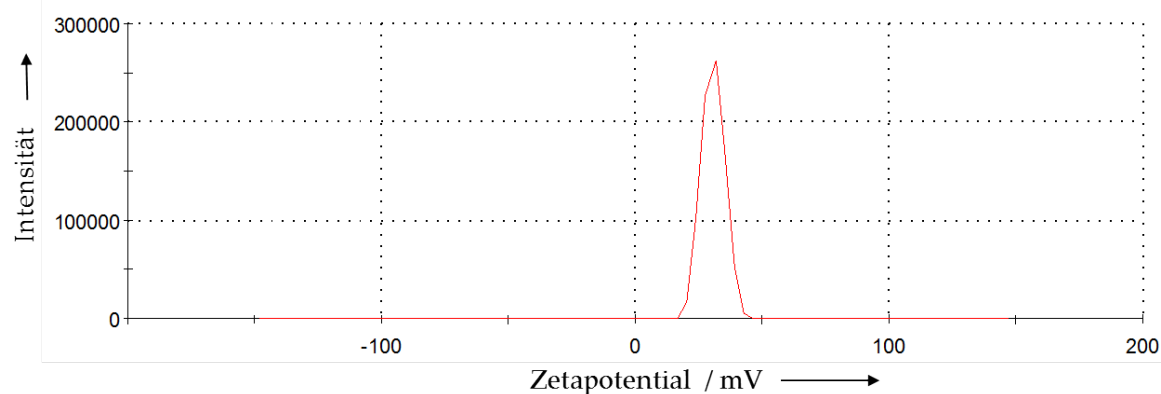


Abbildung 4.62.: Gemessenes Zetapotential von in Wasser redispergierbaren Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Die Partikel wurden mit einer Sonotrode redispergiert. Die Zeit war dabei ein entscheidender Faktor. Bis zu einer Zeit von 30 s behielten die Partikel eine sphärische Morphologie bei. Eine Erhöhung der Zeit führt zu einer Änderung der Morphologie. Es wurden Stäbchen gebildet. In Abbildung 4.63 werden die Partikel gezeigt. Die REM-Aufnahme zeigte eine Größe von 130 nm bis 200 nm. Im Vergleich mit der DLS-Messung stimmten die Durchmesser gut überein.

4. Ergebnisse und Diskussion

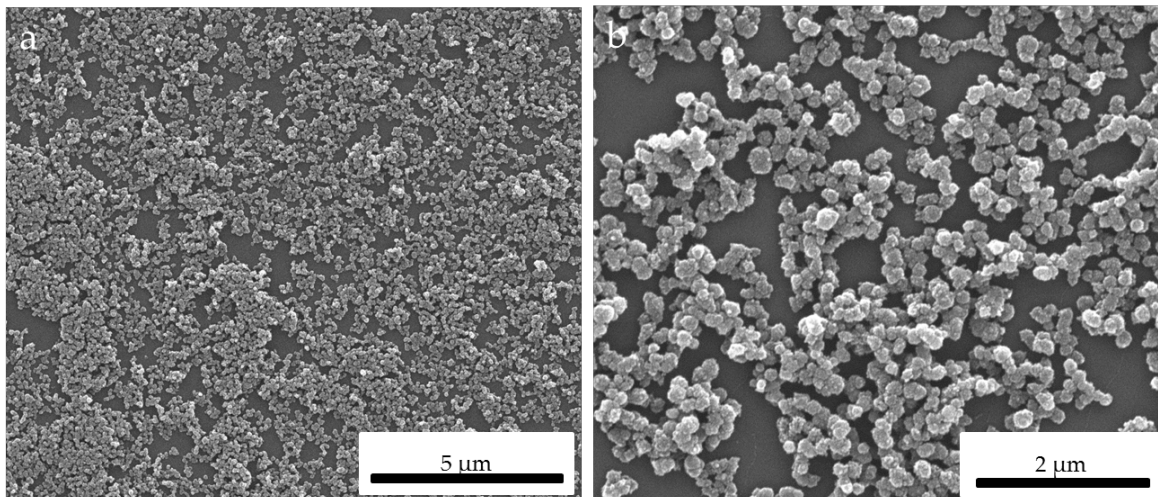


Abbildung 4.63.: REM-Aufnahme von in Wasser redispergierbaren Calciumphosphat-Nanopartikeln nach dem Redispergieren mit einer Sonotrode (30s).

4.3.6.4. Zusammenfassung

Durch eine Funktionalisierung mit PEI ließen sich elektrophoretisch abscheidbare Nanopartikel herstellen. Alle Partikel wurden über eine Fällungsreaktion hergestellt. In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse der Charakterisierung zusammengefasst. Die Größe der Calciumphosphat-Nanopartikel und der Calciumphosphat (CaP)-Nanopartikel, hergestellt mit einer Wasservorlage, waren identisch. Das Zetapotential zeigte abhängig vom Charakter des Polymers ähnliche Werte. Die Werte liegen zwischen 25 und 30 mV. Diese Ergebnisse zeigten eine gute elektrostatische Stabilität der Partikel. Durch die hohe Oberflächenladung waren die Partikel sehr gut geeignet für die elektrophoretische Abscheidung.

Tabelle 4.4.: Zusammenfassung der Calciumphosphat-Nanopartikel Charakterisierung.

Partikel	DLS [nm]	Zetapotential [mV]	PDI	REM [nm]
CaP-Nanopartikel	150	29	0,098	75-120
CaP-Nanopartikel aus Wasservorlage	154	25	0,131	75-120
CaP-Nanopartikel in Wasser redispergier- bar	195	30	0,152	130-200

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Partikel, die mit fluoreszierendem Polymer hergestellt wurden, sind identisch mit PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. Daher wurde keine gesonderte Charakterisierung aufgeführt. Die ermittelten Daten für Calciumphosphat- Nanopartikel galten ebenso für die fluoreszenzmarkierten Partikel.

Biofunktionalisierte Nanopartikel zeigten die gleichen Ergebnisse wie die Partikel, die unter 4.3.6.1, 4.3.6.2 und 4.3.6.3 charakterisiert wurden. Die Größe der Partikel und das Zetapotential wurde durch das verwendete Grundsystem bestimmt. Die verwendete DNA-Konzentration führte zu keiner Umladung der Partikel. Das Zetapotential zeigte eine geringe Änderung, die keinen Einfluss auf die Partikel hatte. Daher waren auch diese Partikel geeignet für die elektrophoretische Abscheidung.

4.4. Elektrophoretische Abscheidung von Calciumphosphat-Nanopartikeln

Die elektrophoretische Abscheidung wird in vielen Gebieten eingesetzt, um die unterschiedlichsten Oberflächen zu beschichten.^[5,52] Diese Art der Abscheidung hat einen hohen Stellenwert in Bezug auf Oberflächenbeschichtungen mit Biomaterialien erreicht.^[1] Implantate haben häufig das Problem, dass sie nicht gut am Knochen anwachsen bzw. eine Gewebearbindung fehlt. Diesem Problem soll mit Oberflächenbeschichtungen entgegengewirkt werden. Um eine bessere Biokompatibilität zu erreichen, werden Schichten mit bioaktiven Materialien aufgebracht. Diese Materialien sind zum größten Teil mit Polymeren funktionalisiert, um eine gute Anhaftung an das Substrat zu gewährleisten. Materialien, die nicht mit Polymer funktionalisiert sind, müssen für eine gute Anhaftung an das Substrat einen weiteren Schritt, eine Wärmebehandlung, durchlaufen. Durch diesen Schritt kann es zu einer Schädigung oder Zerstörung des bioaktiven Materials kommen, welches abgeschieden worden ist. Sehr gut eignet sich eine Funktionalisierung von bioaktiven Partikeln mit PEI, da diese dadurch eine hohe Ladung aufweisen und somit gut elektrophoretisch abgeschieden werden können. Eine gute Anhaftung an das Substrat sowie eine homogene Schicht kann mit dieser Funktionalisierung erzielt werden.

In dieser Arbeit wurden elektrophoretische Abscheidungen aus zwei verschiedenen Medien durchgeführt. Eine Möglichkeit war die Abscheidung von Partikeln aus Alkoholen. Die gewählten Parameter für diese Abscheidungen waren 50 V, Raumtemperatur und eine variable Zeit von 30 s bis zu 2 min. Die zweite Möglichkeit war die Abscheidung von biofunktionalisierten Partikeln aus Wasser. Hier musste die Stromstärke auf 2 V reduziert werden, um eine Elektrophorese des Wassers zu verhindern. Die Abscheidungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und wiederum die Zeit (30 min bis zu 2,5 h) variabel gewählt. Es konnte zwischen drei Abscheide-Substraten gewählt werden: Silicium, Titan und Indiumzinnoxid (ITO). Alle Substrate wurden nach der Beschichtung an der Luft getrocknet.

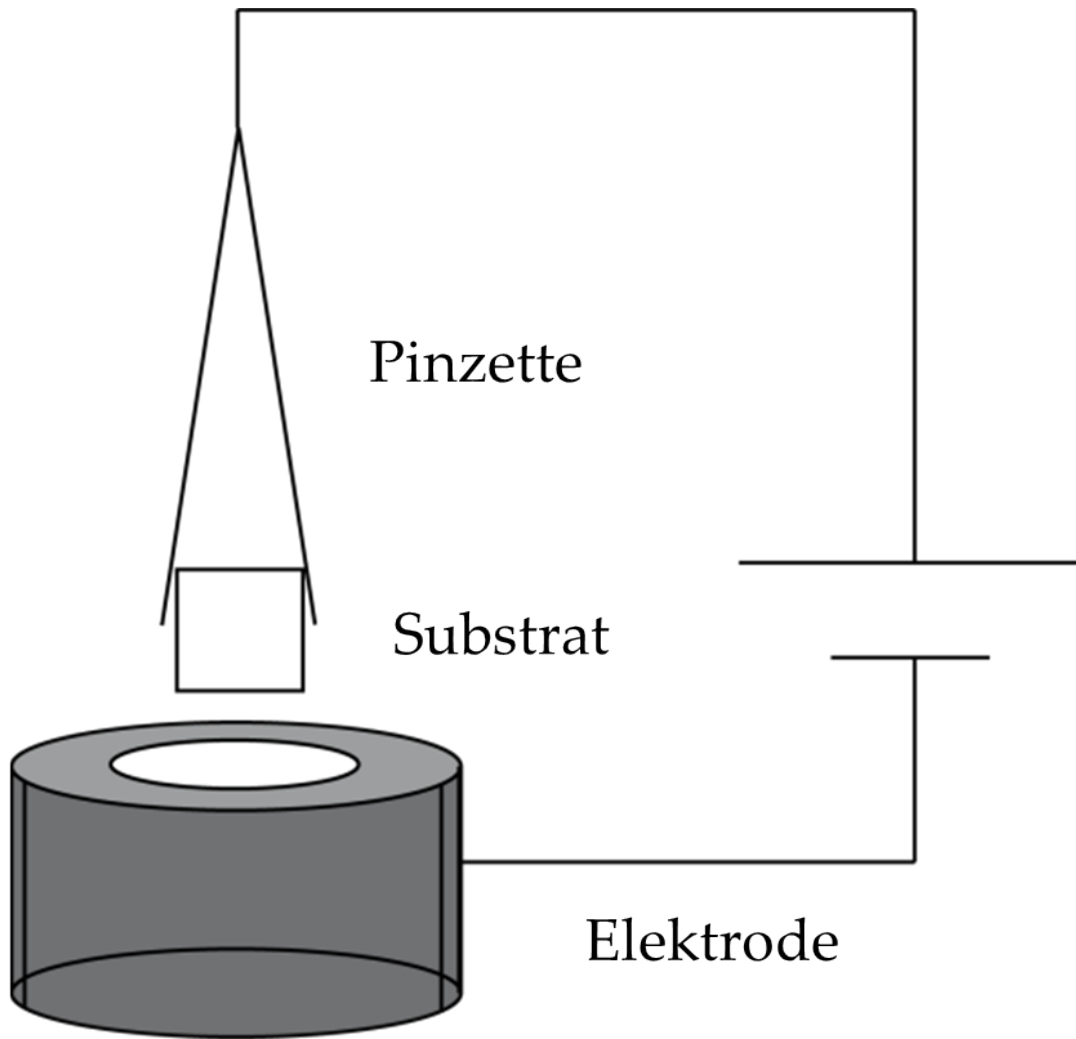


Abbildung 4.64.: Graphische Darstellung einer Abscheide-Apparatur.

In Abbildung 4.64 ist die Abscheide-Apparatur graphisch dargestellt. Als Elektroden wurden eine Pinzette und ein Stahlbecher verwendet. Die Größe des Stahlbechers war variabel, die kleine Elektrode fasst ein Volumen von 1,63 mL und die große Elektrode ein Volumen von 5,38 mL (Abbildung 4.65). Die verwendete Abscheide-Apparatur ist in Abbildung 4.66 gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion



Abbildung 4.65.: Bild der verwendeten Elektroden.

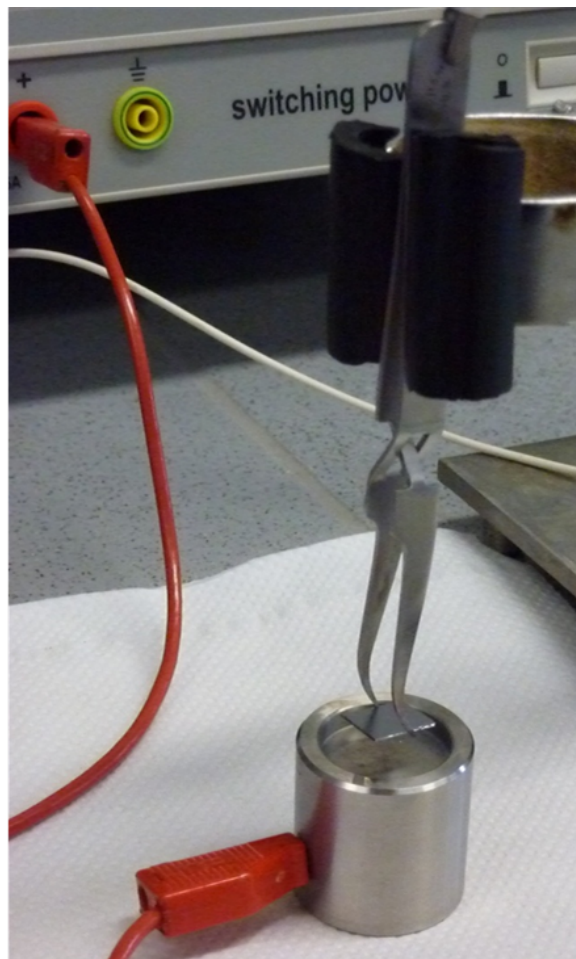


Abbildung 4.66.: Bild der verwendeten Abscheide-Apparatur.

4.4.1. Elektrophoretische Abscheidung mit einer Variation der Abscheide-Parameter

Bei der elektrophoretischen Abscheidung gab es verschiedene Parameter, die variiert werden konnten. In diesem Abschnitt wurde die Größe der Anode variiert und untersucht, in wieweit die Größe der Anode einen Einfluss auf die Abscheidung hatte. Des Weiteren wurden die Abscheidedauer und das Substrat für die Abscheidung variiert. Hierbei wurden Substrate aus Silicium (Si) und Titan (Ti) verwendet. Silicium wurde für Substrate mit einer glatten Oberfläche als Modell ausgewählt und Titan für Substrate mit einer rauen Oberflächenbeschaffenheit (Abbildung 4.67). Die Abscheidespannung wurde jeweils an den Typ der abzuscheidenden Partikel angepasst. Bei einer Abscheidung aus einer Isopropanol-Dispersion wurde bei einer Spannung von 50 V abgeschieden, sobald Wasser in der Dispersion vorhanden war, wurde bei 2 V abgeschieden, um eine Elektrophorese des Wassers zu vermeiden. In den Abbildungen 4.68 und 4.69 werden Abscheidungen gezeigt, die mit Nanopartikeln aus einer Wasservorlage hergestellt wurden (Herstellung 4.3.2). Diese Partikel wurden in einem Verhältnis von 4 mL Partikel-Dispersion zu 5 mL Ethanol gemischt. Die Abscheidungen wurden bei einer Spannung von 2 V durchgeführt, hierbei wurden die Abscheidezeit und die Elektrodengröße variiert. Es zeigte sich, dass die Größe der Elektrode einen entscheidenden Einfluss auf die Menge der abgeschiedenen Partikel hat. Um eine Multilage zu erhalten, reicht eine Abscheidezeit von 20 min, wenn eine große Anode verwendet wird. Die Partikel wurden auf Silicium abgeschieden.

4. Ergebnisse und Diskussion

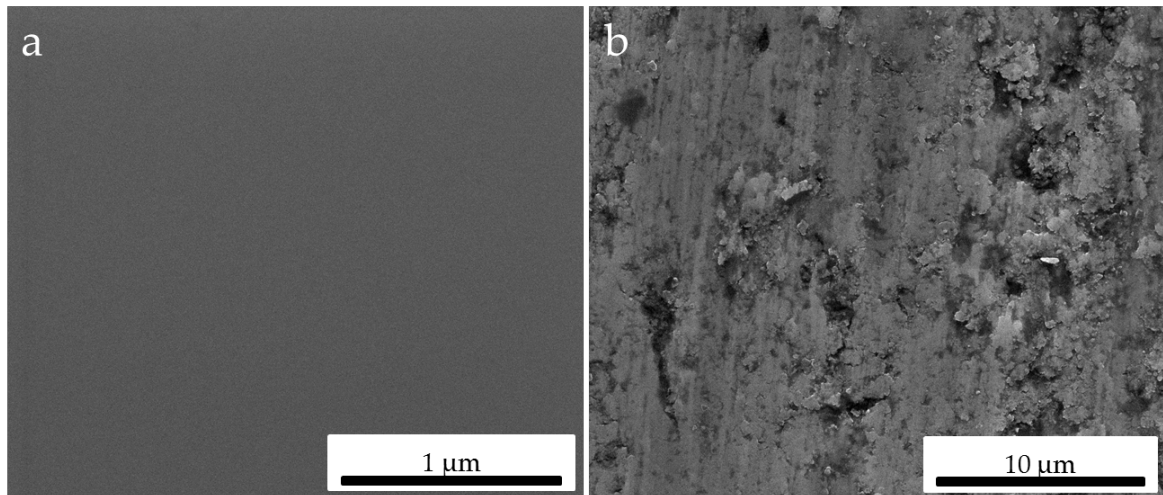


Abbildung 4.67.: Silicium- und Titan-Substrate vor der Abscheidung, a) Silicium, b) Titan.

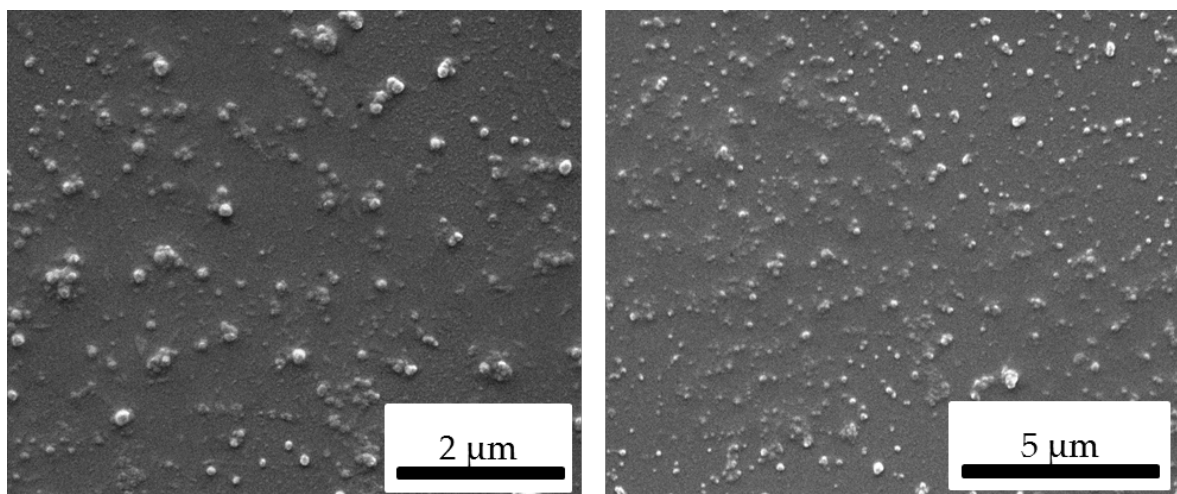


Abbildung 4.68.: Calciumphosphat-Nanopartikel aus einer Wasservorlage gemischt mit Ethanol, in einem Verhältnis von 4 mL zu 5 mL. Abgeschieden auf Silicium bei 2 V für 2 h mit einer kleinen Anode.

4. Ergebnisse und Diskussion

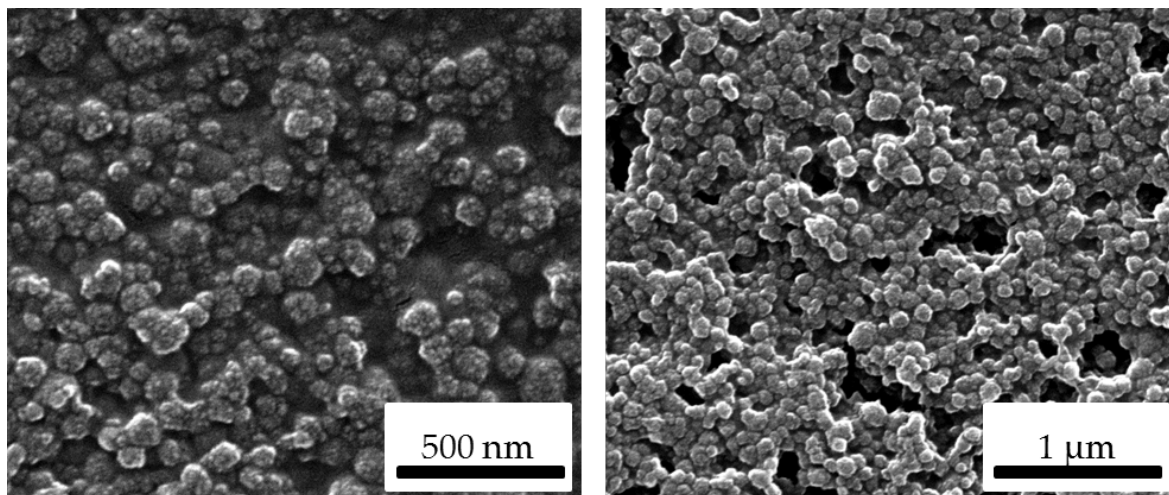


Abbildung 4.69.: Calciumphosphat-Nanopartikel aus einer Wasservorlage gemischt mit Ethanol, in einem Verhältnis von 4 mL zu 5 mL. Abgeschieden auf Silicium bei 2 V für 20 min mit einer großen Anode.

Um zu ermitteln wie die Abscheidezeit die Abscheidung beeinflusst, wurden Abscheidungen auf Titan durchgeführt. Es wurden Zeiten zwischen 1,5 h und 3 h gewählt. In Abbildung 4.70 sind REM-Aufnahmen einer elektrophoretischen Abscheidung nach einer Abscheidezeit von 1,5 h zu sehen. Es wurden die gleichen Partikel (wie oben beschrieben) für die Abscheidung verwendet. Es zeigte sich, dass sich keine vollständige Schicht auf der Titanoberfläche gebildet hatte. Die Schicht war unregelmäßig und es hatten sich Inseln aus Nanopartikeln gebildet. Wenn die Zeit erhöht wurde (2,5 h) bildeten sich Multilagen und eine einheitliche Schicht auf der Titan-Oberfläche (Abbildung 4.71). Eine weitere Erhöhung auf 3 h brachte hingegen keine weitere Verbesserung der Schicht (Abbildung 4.72). Die Dicke der Schicht nahm weiter zu, was dazu führte, dass die Trocknungsrisse ebenso zunahmen und tiefer wurden. Dadurch nahm die Homogenität der Schicht wieder ab.

4. Ergebnisse und Diskussion

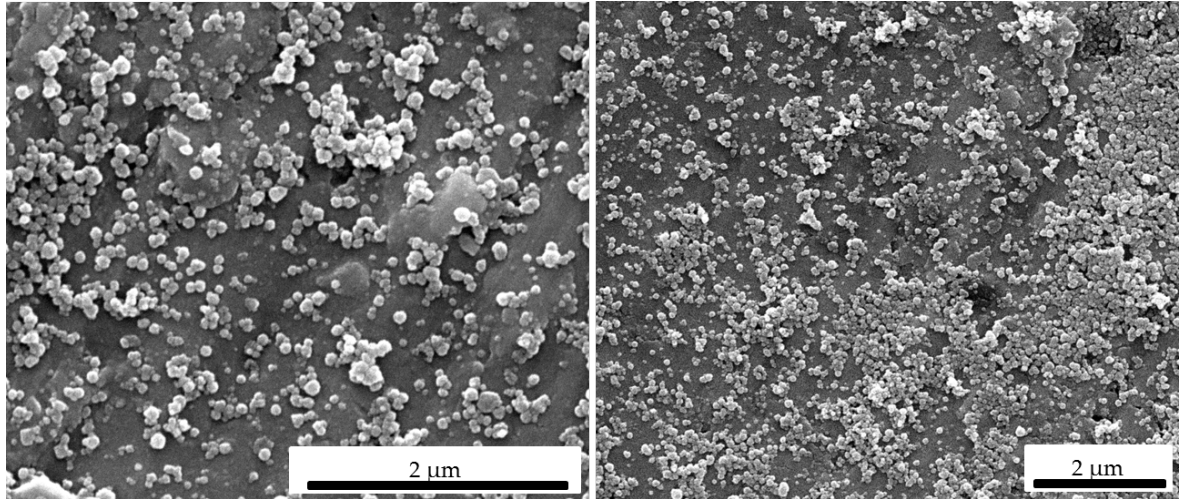


Abbildung 4.70.: Calciumphosphat-Nanopartikel aus einer Wasservorlage gemischt mit Ethanol, in einem Verhältnis von 4 mL zu 5 mL. Abgeschieden auf Titan bei 2 V für 1,5 h mit einer kleinen Anode.

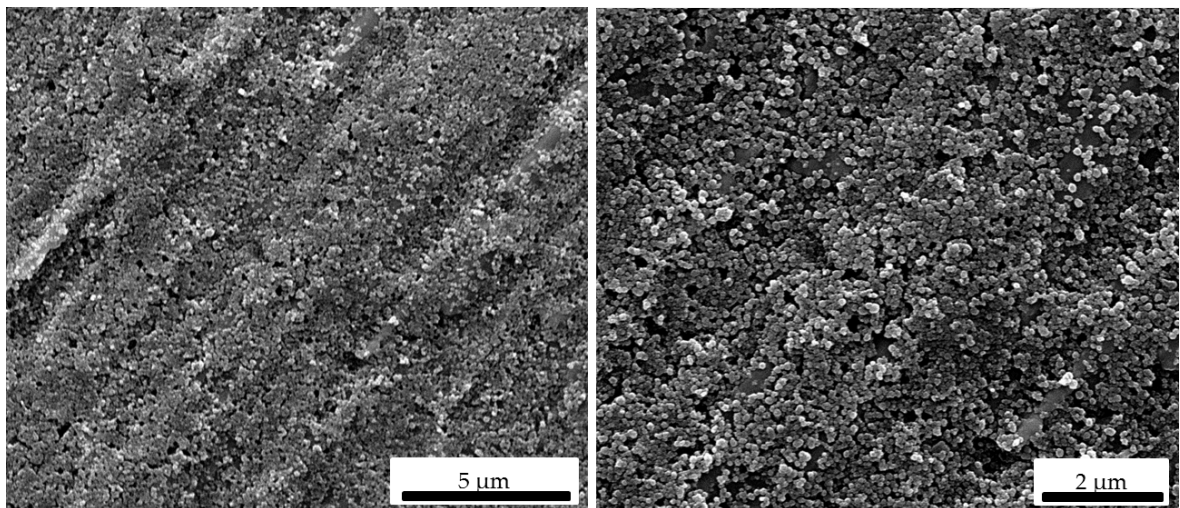


Abbildung 4.71.: Calciumphosphat-Nanopartikel aus einer Wasservorlage gemischt mit Ethanol, in einem Verhältnis von 4 mL zu 5 mL. Abgeschieden auf Titan bei 2 V für 2,5 h mit einer kleinen Anode.

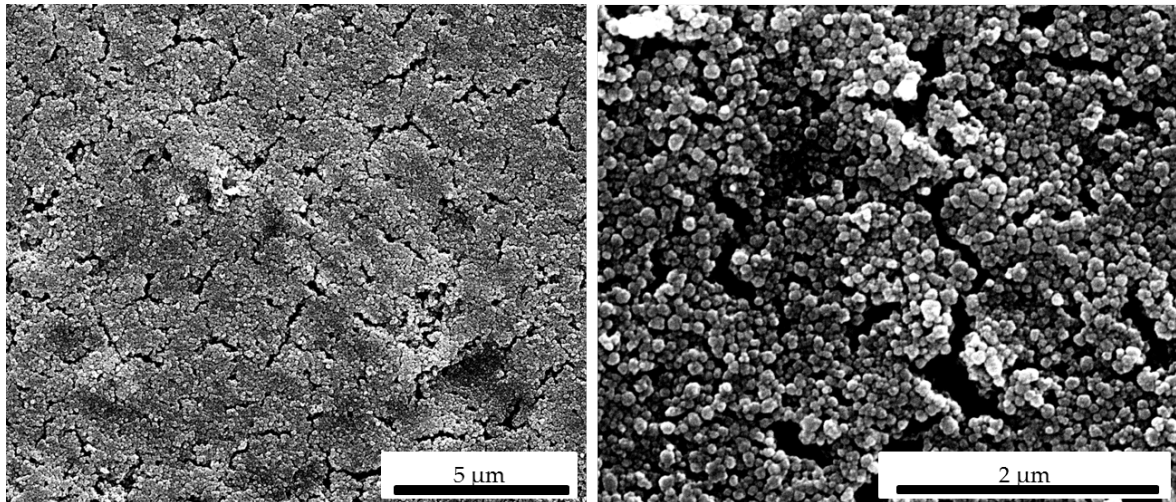


Abbildung 4.72.: Calciumphosphat-Nanopartikel aus einer Wasservorlage gemischt mit Ethanol, in einem Verhältnis von 4 mL zu 5 mL. Abgeschieden auf Titan bei 2 V für 3 h mit einer kleinen Anode.

Der Einfluss, den die Anoden-Größe hatte, wurde weiter oben erläutert. Es zeigt sich in Abbildung 4.73, dass die Schichtdicke für Abscheidungen von 10 und 20 min auf Silicium fast identisch waren. Es bildeten sich Multilagen aus. Im Vergleich dazu wurden Abscheidungen auf Titan mit einer kleinen Anode durchgeführt. Für Titan-Substrate wurde grundsätzlich mit einer kleinen Anode abgeschieden, da durch die raue Oberfläche die Partikel besser an der Oberfläche anhafteten. Es zeigte sich, dass sich keine homogene Schicht auf der Oberfläche der Ti-Substrate ausbildete (Abbildung 4.74 a). Eine Erhöhung der Zeit brachte in diesem Fall keine große Änderung in Bezug auf die Schichtdicke (Abbildung 4.74 b). Um ein ähnliches Ergebnis, wie in Abbildung 4.73 zu sehen ist, zu erhalten, musste die Anoden-Größe oder die Zeit vergrößert bzw. erhöht werden. Ab einer Abscheidezeit von 2,5 h bildeten sich homogene Schichten auf Titan aus (siehe 4.71). Die Abscheidungen wurden mit Partikeln mit einem Ethanol-Wassergemisch hergestellt, wie oben beschrieben. Auch hier wurden alle Abscheidungen bei 2 V durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

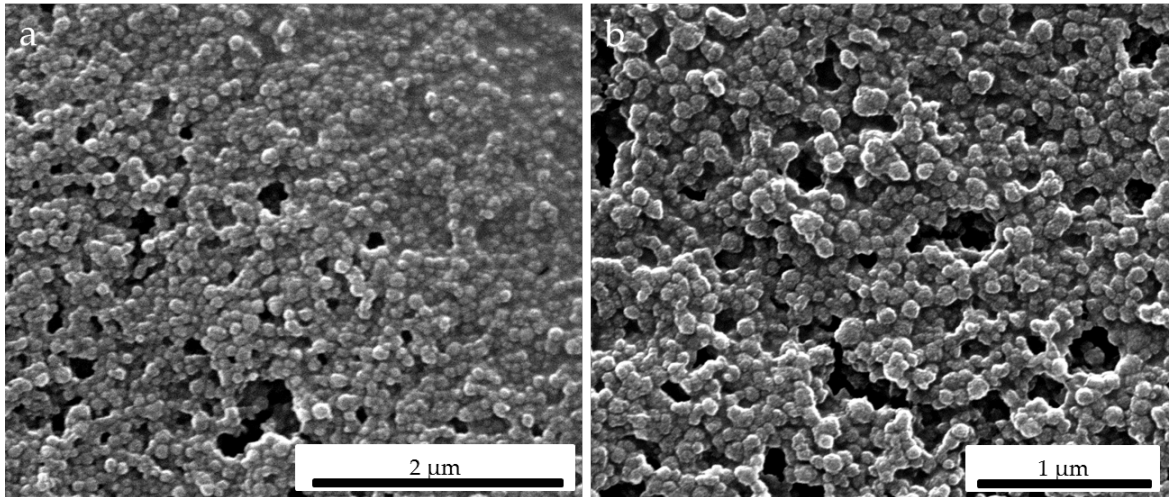


Abbildung 4.73.: Calciumphosphat-Nanopartikel aus einer Wasservorlage gemischt mit Ethanol, in einem Verhältnis von 4 mL zu 5 mL. Abgeschieden auf Silicium bei 2 V für a) 10 min und b) 20 min mit einer großen Anode.

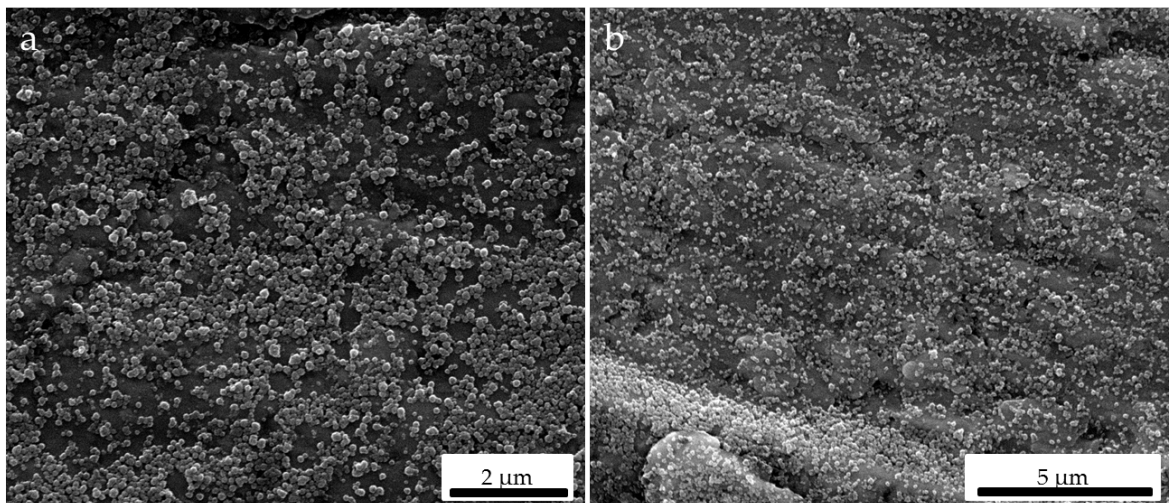


Abbildung 4.74.: Calciumphosphat-Nanopartikel aus einer Wasservorlage gemischt mit Ethanol, in einem Verhältnis von 4 mL zu 5 mL. Abgeschieden auf Titan bei 2 V für a) 10 min und b) 20 min mit einer kleinen Anode.

Die nächsten Abscheidungen wurden mit Calciumphosphat-Nanopartikeln in Ethanol durchgeführt (Herstellung 4.3.1). Die Abscheidespannung betrug 50 V. Als Abscheide-Substrat wurde Titan gewählt. Die Abscheidungen wurden mit einer kleinen Anode durchgeführt. In Abbildung 4.75 sind REM-Aufnahmen von Ab-

4. Ergebnisse und Diskussion

scheidungen mit einer Abscheidedauer von 30 s zu sehen. Es zeigte sich eine homogene Schicht auf dem beschichteten Titan-Substrat.

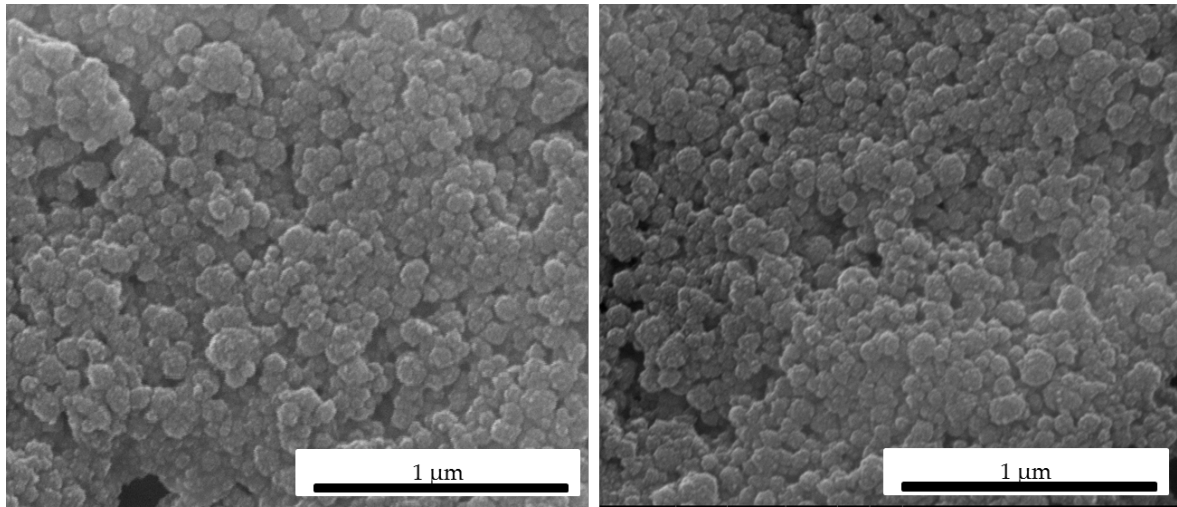


Abbildung 4.75.: Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol abgeschieden auf Titan bei 50 V für 30 s mit einer kleinen Anode.

Bei einer Zeiterhöhung auf 30 min (Abbildung 4.76) zeigte sich eine Clusterbildung auf dem Substrat. Es bildeten sich Inseln mit Nanopartikeln, dadurch wurde die Schicht des Substrates sehr inhomogen. Das untere Bild der Abbildung 4.76 zeigt eine nähere Sicht auf eine dieser Inseln.

4. Ergebnisse und Diskussion

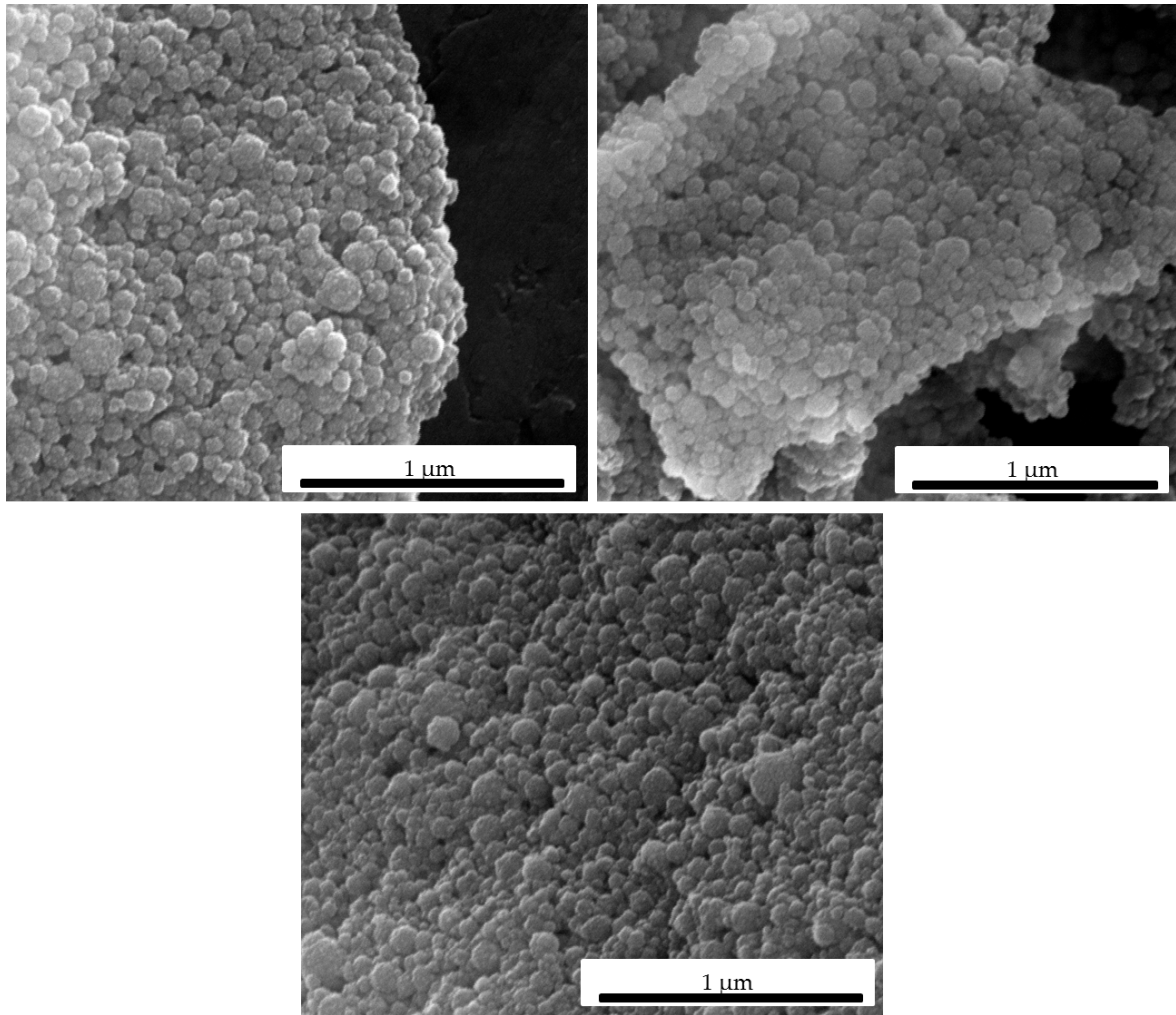


Abbildung 4.76.: Calciumphosphat-Nanopartikel abgeschieden auf Ti bei 50 V für 30 min mit einer kleinen Anode.

Elektrophoretische Abscheidungen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln wurden schon von H. Urch und M. Neumeier in der Arbeitsgruppe von Prof. Epple durchgeführt.^[6,7] Neumeier zeigte, dass es nicht möglich ist Monolagen elektrophoretisch auf unstrukturierte Silicium-Substraten abzuscheiden. Ihm gelang es auf nanostrukturierte Silicium-Substrate, mit einer Variation der Abscheideparameter, eine Monolage zu erzeugen. Für die Erzeugung der Monolage wurde eine Mischspannung aus 5 V Gleichspannung und 10 V Wechselspannung angelegt. Die Dispersionstemperatur wurde auf 50 °C erhöht, die Abscheidezeit betrug 30 s. Durch die Erhöhung der Temperatur wurden mehr Partikel pro Zeit abgeschieden. Durch die Mischspannung variierte die angelegte Spannung zwischen -5 V und +15 V, was

dazu führte, dass Partikel die noch nicht festgebunden waren sich wieder ablösen konnten und sich an einer geeigneteren Stelle wieder abscheiden konnten.

4.4.2. Elektrophoretische Abscheidung mit einem kontinuierlichen Flussreaktor

Bei der Abscheidung aus Alkoholen stellte sich heraus, dass die Bildung einer Monolage Nanopartikel auf einem unstrukturierten Substrat, bei den untersuchten Parametern nicht möglich ist. Die optimalen Beschichtungsparameter für strukturierte Substrate wurden in einer früheren Arbeit ermittelt. Epple *et al.* zeigten die Möglichkeit auf, mit einer Mischspannung und einer Erhöhung der Temperatur Monolagen auf einem strukturierten Substrat abzuschneiden.^[161] Um die Qualität der abgeschiedenen Schichten zu verbessern, sollte die Hydrodynamik als weiterer Parameter eingefügt werden. In Abbildung 4.77 ist der schematische Aufbau der Anlage dargestellt. Eine Peristaltik-Pumpe sorgt für den Umlauf der Nanopartikel, was eine bessere Dosierung der Nanopartikel erlaubt. Es existieren hierbei zwei Arten von möglichen Strömungen, wirbelfreie und nicht wirbelfreie Strömungen.^[162] Versuche mit Farbstoffen zeigten, dass die erzeugte Strömung nicht wirbelfrei ist. In Abbildung 4.78 ist die verwendete Abscheideapparatur abgebildet.

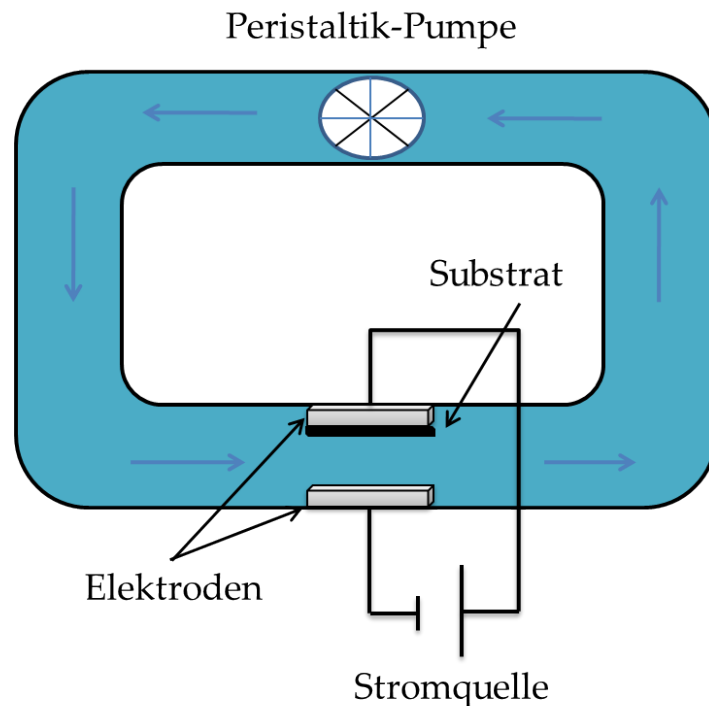


Abbildung 4.77.: Schematische Darstellung des kontinuierlichen Flussreaktors.

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Strömungsgeschwindigkeit wurde auf $6,5 \text{ mL min}^{-1}$ eingestellt. Als Substrate wurden strukturiertes und unstrukturiertes Silicium sowie Titan verwendet. Die strukturierten Substrate wurden im Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert hergestellt. Eine Erläuterung der Herstellung ist in Kapitel 4.5.0.3 gegeben. Es wurden drei verschiedene Arten an Calciumphosphat-Nanopartikeln verwendet, in Isopropanol redispersierbare Nanopartikel (4.3.1), Nanopartikel, die mit einer Wasservorlage hergestellt wurden (4.3.2), und in Wasser redispersierbare Nanopartikel (4.3.3).

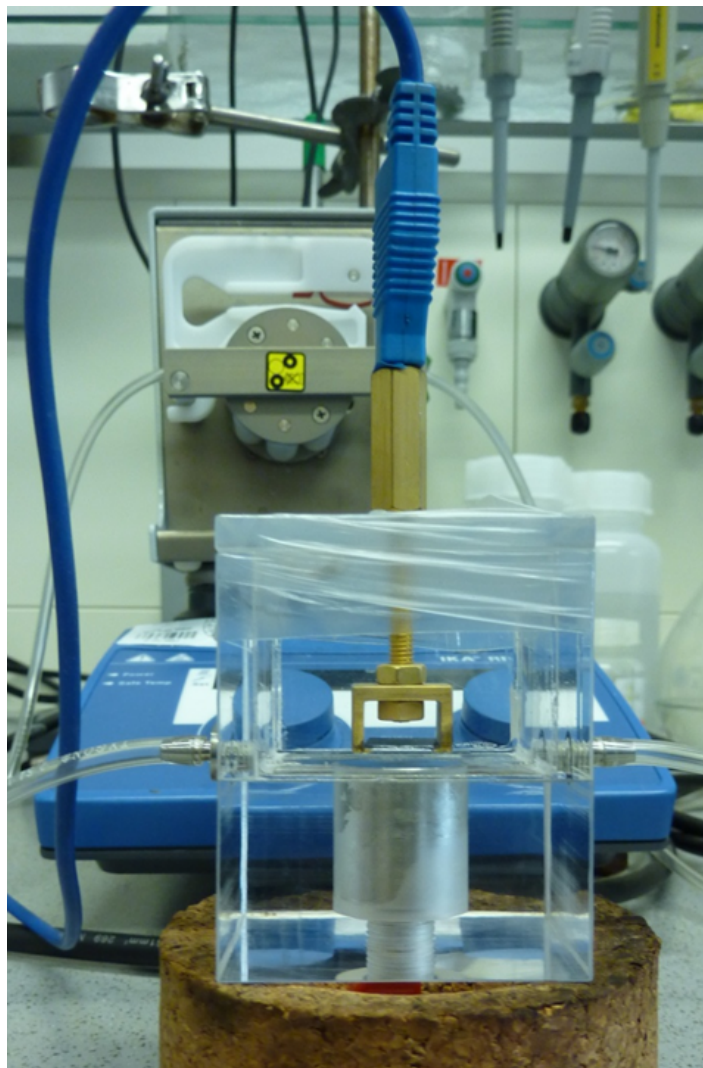


Abbildung 4.78.: Abbildung des verwendeten kontinuierlichen Flussreaktors.

Die ersten Abscheideversuche wurden mit in Isopropanol redispergierbaren Nanopartikeln durchgeführt. Hierbei wurde eine Spannung von 50 V und einer Abscheidezeit von 30 s bis 1 min verwendet. In Abbildung 4.79 werden REM-Aufnahmen von der Abscheidung auf Si für 1 min gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine dicke Partikelschicht abgeschieden wurde. Die Schicht ist unregelmäßig mit agglomerierten Partikel-Inseln. Nach einer Reduktion der Zeit auf 30 s bildete sich eine unregelmäßige Schicht aus Nanopartikeln aus. Diese besaßen ebenfalls Inseln mit größeren Agglomeraten. Die Schicht auf dem Substrat zeigte einige Stellen die keine komplette Schicht an Partikeln aufwiesen und das Si noch unter den Partikeln zu sehen war (Abbildung 4.80).

4. Ergebnisse und Diskussion

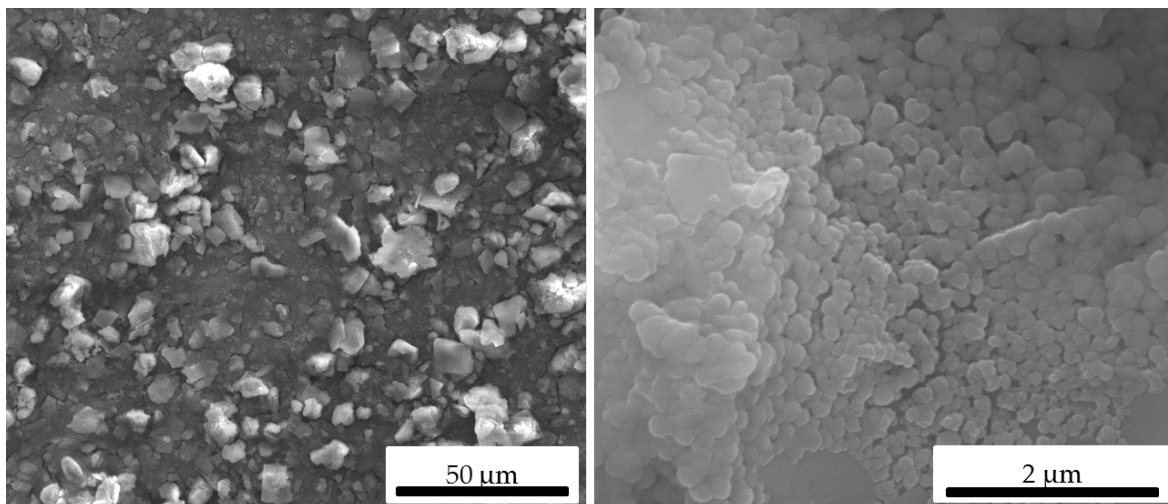


Abbildung 4.79.: Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PEI, abgeschieden auf Silicium bei 50 V für 1 min mit einem kontinuierlichen Flussreaktor.

Versuche mit strukturieren Silicium-Substraten zeigten, dass die Partikel auf den Strukturen eine zu dicke Schicht bildeten, so dass die Strukturen unter den Partikel vergraben wurden.

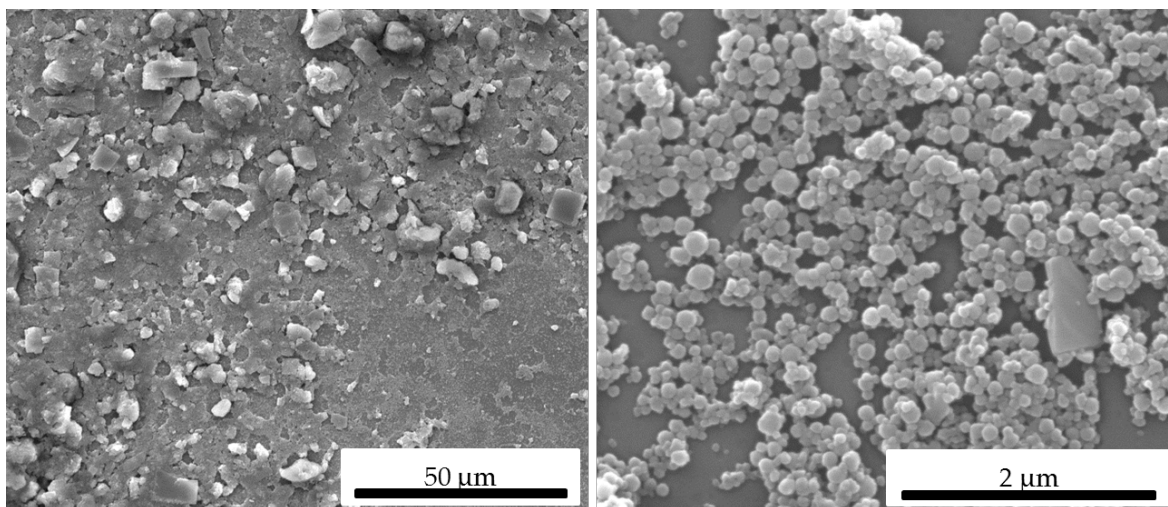


Abbildung 4.80.: Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PEI abgeschieden, auf Silicium bei 50 V für 30 s mit einem kontinuierlichen Flussreaktor.

Die gleichen Versuche wurden mit Titan durchgeführt. Dort zeigte sich ein ähnliches Bild der Beschichtung ab. In Abbildung 4.81 sieht man eine einheitlichere Schicht als

4. Ergebnisse und Diskussion

beim Silicium. Die Schichtdicke ist hoch, so dass sich beim Trocknen Risse bildeten. Auch hier zeigten sich Inseln mit agglomerierten Partikeln. Eine Reduktion der Zeit auf 30 s zeigte eine geringere Schichtdicke (Abbildung 4.82). Es bildeten sich aber ebenfalls wieder Inseln mit agglomerierten Partikeln. Des Weiteren zeigte sich, dass die Schicht nicht homogen auf das Substrat abgeschieden wurde. Die Schicht zeigte Lücken in denen das Titan noch sichtbar war.

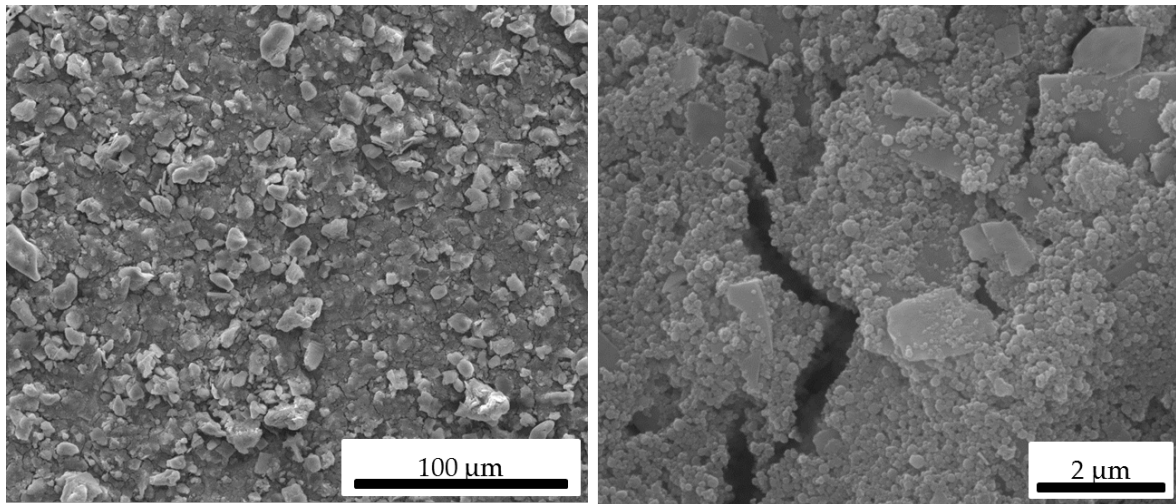


Abbildung 4.81.: Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PEI abgeschieden, auf Titan bei 50 V für 1 min mit einem kontinuierlichen Flussreaktor.

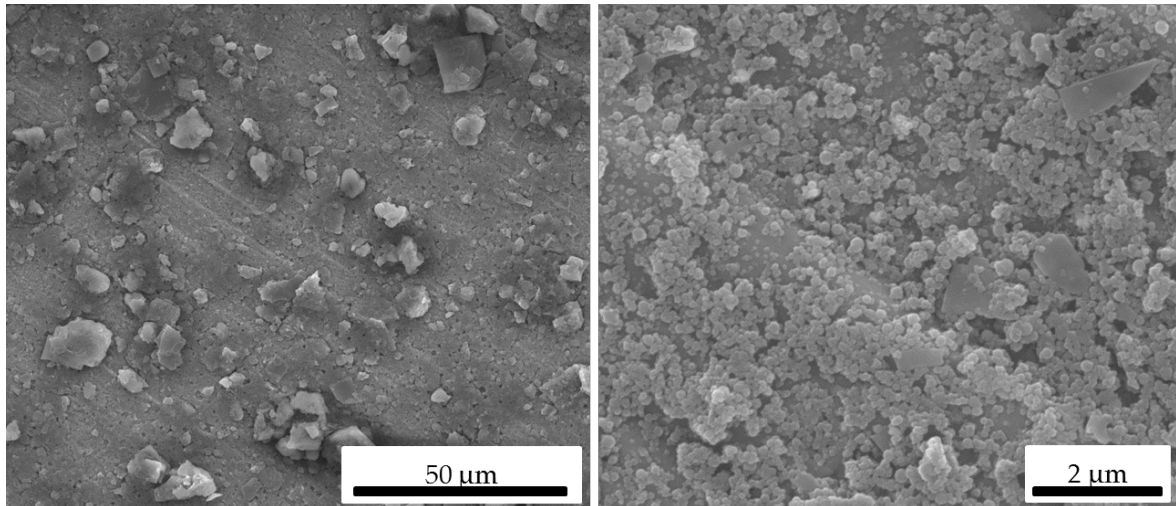


Abbildung 4.82.: Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PEI abgeschieden, auf Titan bei 50 V für 30 s mit einem kontinuierlichen Flussreaktor.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die folgenden Abscheidungen mit dem kontinuierlichen Flussreaktor wurden im Wasser durchgeführt. Daher wurde die verwendete Spannung auf 2 V reduziert. Die Abscheidezeit wurde auf 1 h festgelegt. In Abbildung 4.83 sind REM-Aufnahmen von nicht aufgereinigten Calciumphosphat-Nanopartikel, abgeschieden auf Silicium, dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nur wenige Partikel abgeschieden worden sind. Es wurde keine homogene Schicht abgeschieden. Des Weiteren hatte sich freies überschüssiges Polymer auf den Partikeln mit abgeschieden.

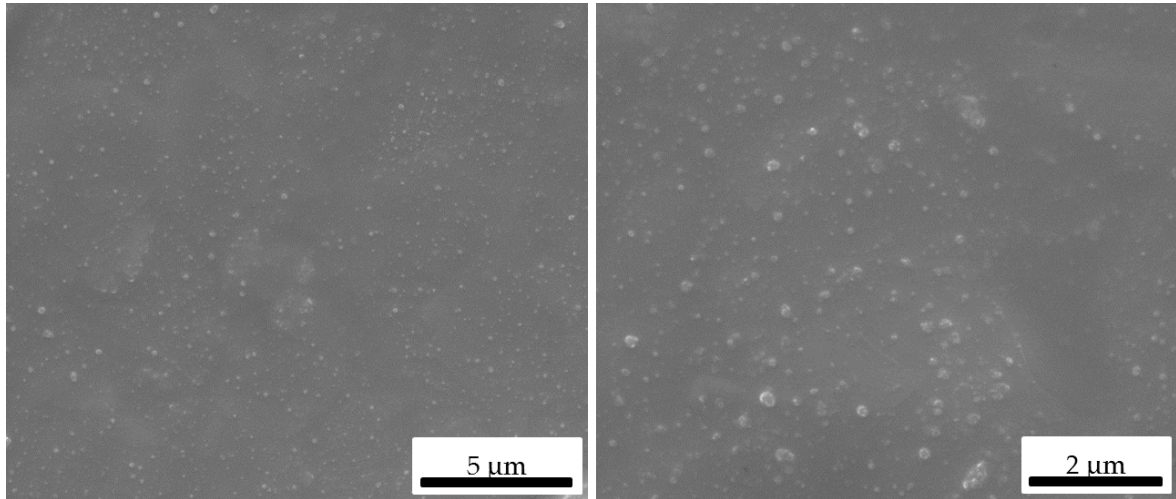


Abbildung 4.83.: Calciumphosphat-Nanopartikel, hergestellt mit einer Wasservorlage abgeschieden, auf Silicium bei 2 V für 1 h mit einem kontinuierlichen Flussreaktor.

Im Vergleich zu der glatten Fläche auf dem Si-Substrat zeigte sich auf den strukturierten Bereichen eine etwas höhere abgeschiedene Partikel-Menge. In Abbildung 4.84 sieht man auf dem ersten Bild abgeschiedene Agglomerate der Partikel. Es zeigten sich allerdings auch Bereiche auf der Strukturierung, auf denen keine Partikel abgeschieden worden sind.

4. Ergebnisse und Diskussion

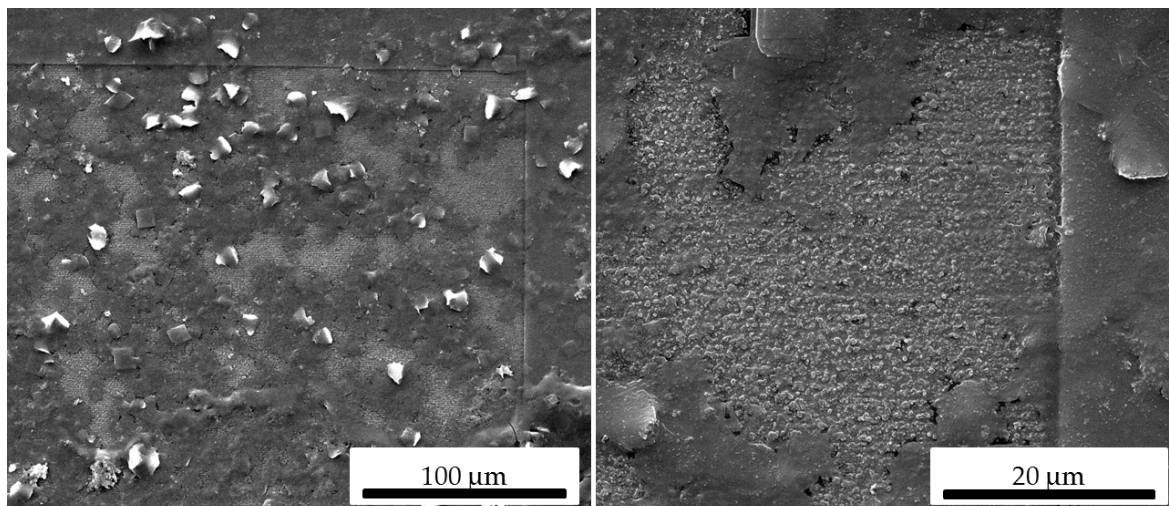


Abbildung 4.84.: Calciumphosphat-Nanopartikel, hergestellt mit einer Wasservorlage abgeschieden, auf Silicium bei 2 V für 1 h mit einem kontinuierlichen Flussreaktor.

Die Abscheidungen wurden ebenfalls auf Titan durchgeführt. Auf der raueren Oberfläche wurden mehr Partikel abgeschieden als auf dem glatten Silicium (Abbildung 4.88). Auch hier zeigte sich wieder das überschüssige Polymer, welches mit abgeschieden worden ist. Die abgeschiedene Schicht ist inhomogen und nicht durchgängig.

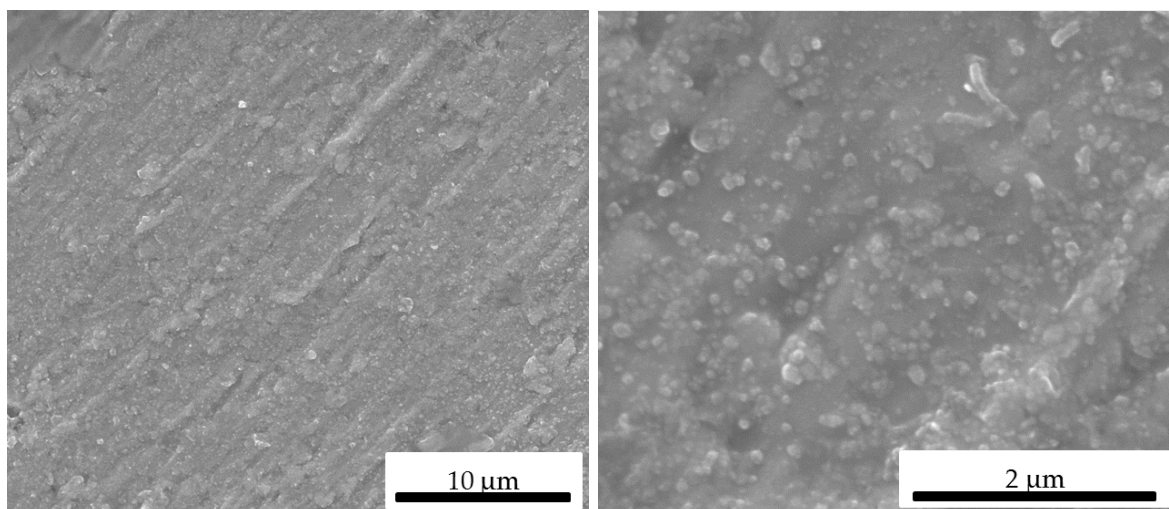


Abbildung 4.85.: Calciumphosphat-Nanopartikel, hergestellt mit einer Wasservorlage abgeschieden, auf Titan bei 2 V für 1 h mit einem kontinuierlichen Flussreaktor.

4. Ergebnisse und Diskussion

Um eine Abscheidung des überschüssigen Polymers zu vermeiden wurden Abscheidungen mit aufgereinigten Partikeln durchgeführt. Die Abscheidungen wurden bei einer Spannung von 2 V für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. In Abbildung 4.86 sind REM-Aufnahmen der Abscheidung auf unstrukturiertem Silicium dargestellt. Es zeigte sich, dass die Partikel als Inseln auf dem Silicium abgeschieden worden sind. Polymer Abscheidungen konnten vermieden werden.

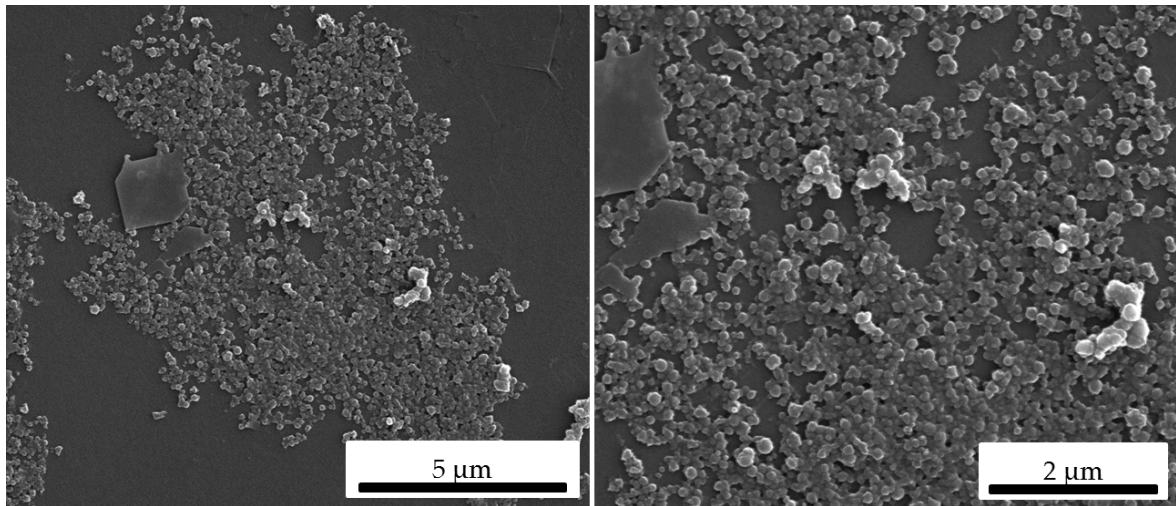


Abbildung 4.86.: Calciumphosphat-Nanopartikel in Wasser redispergiert abgeschieden, auf Silicium bei 2 V für 1 h mit einem kontinuierlichen Flussreaktor.

Die Abscheidungen auf strukturierte Bereiche zeigten, dass sich vermehrt Agglomerate auf den Strukturen abgeschieden hatten. In Abbildung 4.87 sind die Agglomerate auf den Strukturen abgebildet. Auch hier zeigte sich keine homogene Schicht nach der Abscheidung.

4. Ergebnisse und Diskussion

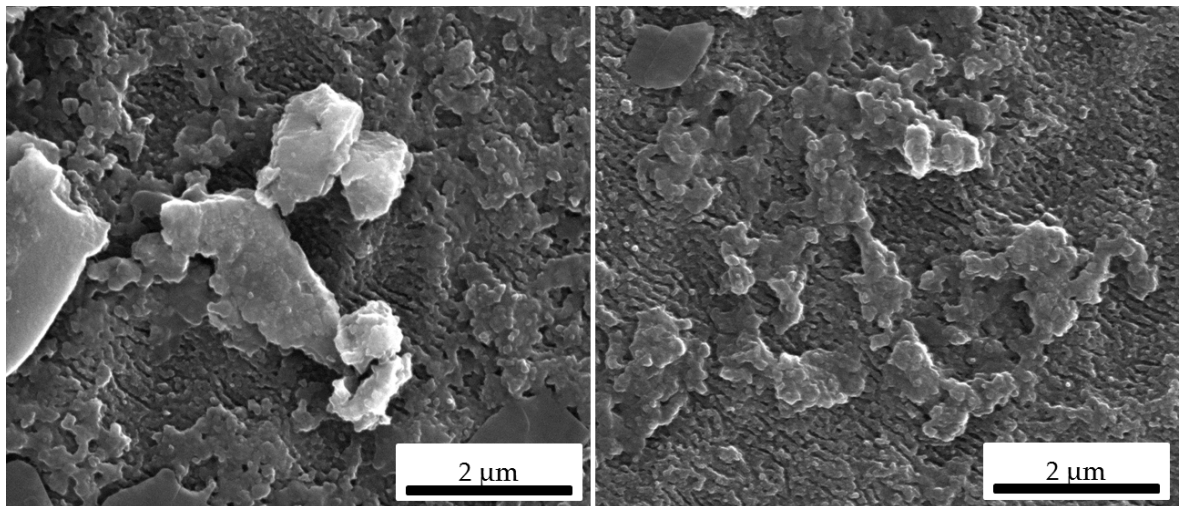


Abbildung 4.87.: Calciumphosphat-Nanopartikel in Wasser redispergiert abgeschieden, auf Silicium bei 2 V für 1 h mit einem kontinuierlichen Flussreaktor.

Die raue Oberfläche des Titans zeigte hier keine Verbesserung bei der Abscheidung. Es wurde nur eine geringe Anzahl an Partikeln abgeschieden. Die entstandene Schicht ist sehr inhomogen und nicht durchgängig.

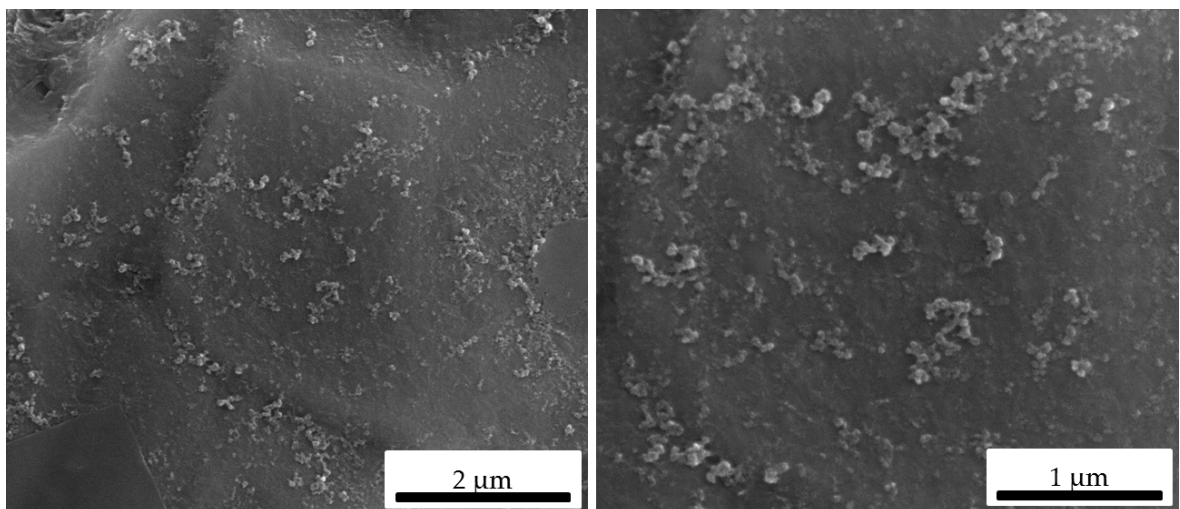


Abbildung 4.88.: Calciumphosphat-Nanopartikel in Wasser redispergiert abgeschieden, auf Titan bei 2 V für 1 h mit einem kontinuierlichen Flussreaktor.

Die Einführung eines weiteren Abscheideparameters, um die Abscheidung zu verbessern, zeigte keine qualitative Verbesserung der Schicht. Auf strukturierten Be-

reichen, auf denen mit einer Mischspannung eine Monolage abgeschieden werden konnte, zeigten eine Tendenz zur Abscheidung von größeren Nanopartikel-Agglomeraten, während auf Silicium und Titan keine homogene Schicht abgeschieden wurde.

4.4.3. Elektrophoretische Abscheidung von biofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln

Um die optimalen Abscheideparameter für Abscheidungen für die nachfolgenden Transfektionsversuche zu ermitteln, wurden Abscheidungen mit biofunktionalisierten Nanopartikeln durchgeführt (Herstellung 4.3.5). Die Partikel wurden mit zwei verschiedenen DNA-Arten funktionalisiert. Es wurde Heringssperma-DNA < 50 Basenpaare und Heringssperma-DNA > 50 Basenpaare verwendet. Alle Abscheidungen wurden bei 2 V durchgeführt, da die Abscheidungen in einem wässrigen Medium durchgeführt wurden. Für die Abscheidungen wurden gefriergetrocknete Calciumphosphat-Nanopartikel (Herstellung 4.3.1) mit einer Konzentration von 2 mg mL^{-1} in Ethanol redispergiert und anschließend 1:1 mit Wasser verdünnt. Bei den folgenden Abscheidungen wurde die DNA-Konzentration, sowie die Abscheidezeit variiert. In Abbildung 4.89 werden REM-Aufnahmen von Abscheidungen gezeigt mit Heringssperma-DNA < 50 Basenpaare, die Konzentration der zugegebenen DNA betrug $15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Abbildung 4.89 a zeigt nach einer Abscheidezeit von 20 min eine nicht geschlossene Monolage an biofunktionalisierten Nanopartikeln. Nach einer Erhöhung der Abscheidezeit auf 30 min wurde die Monolage auf dem Silicium-Substrat immer dichter, allerdings entstand keine geschlossene Schicht an Nanopartikeln.

4. Ergebnisse und Diskussion

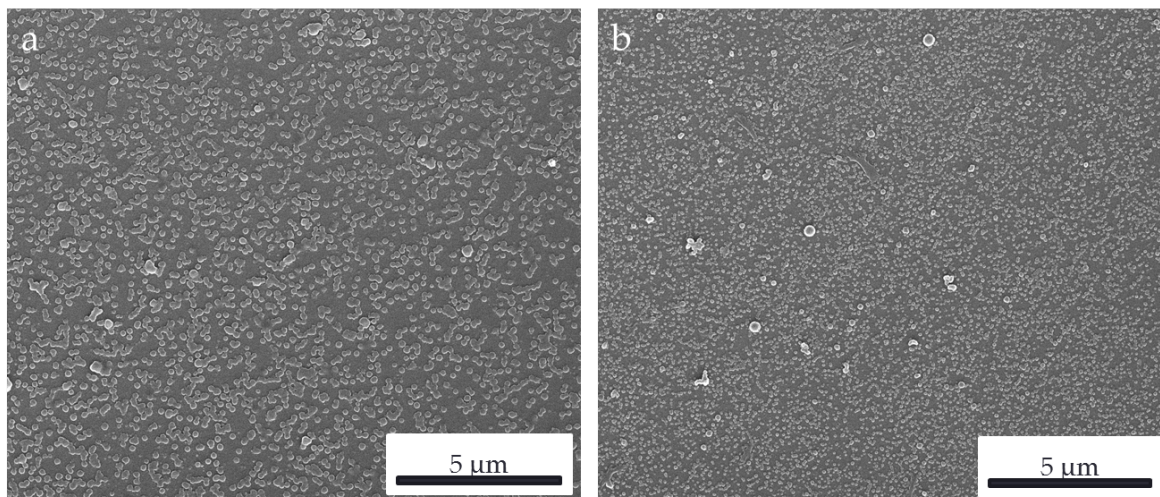


Abbildung 4.89.: REM-Aufnahme von abgeschiedenen biofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln; a) Heringssperma-DNA < 50 Basenpaare, Konzentration: $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, Abscheidezeit: 20 min, Abscheidespannung 2 V, b) Heringssperma-DNA < 50 Basenpaare, Konzentration: $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, Abscheidezeit: 30 min, Abscheidespannung 2 V.

In Abbildung 4.90 wurde die DNA Konzentration an Heringssperma-DNA < 50 Basenpaare auf $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ erhöht. Die REM-Aufnahmen zeigen eine Verdichtung der Monolage auf dem Substrat. Das Substrat zeigte eine sehr homogene Schicht.

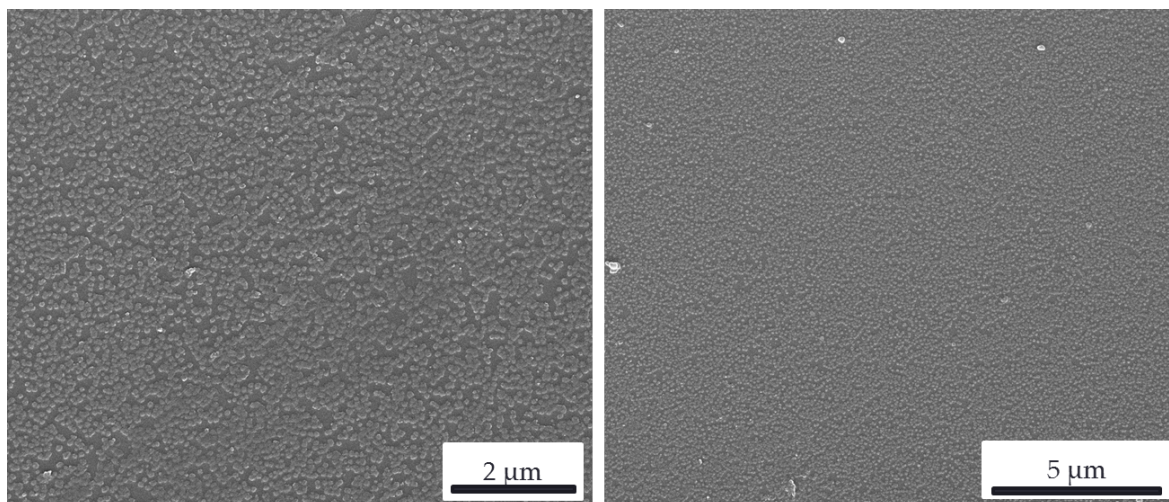


Abbildung 4.90.: REM-Aufnahme von abgeschiedenen biofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln; Heringssperma-DNA < 50 Basenpaare, Konzentration: $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, Abscheidezeit: 30 min, Abscheidespannung 2 V.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die folgenden REM-Aufnahmen zeigen Abscheidungen mit biofunktionalisierten Nanopartikeln mit Heringssperma-DNA > 50 Basenpaaren. Die gewählten Konzentrationen an DNA waren $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Die Abscheidedauer für die Partikel mit einer DNA Konzentration von $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ betrug 25 min. Es zeigte sich eine sehr inhomogene Schicht an abgeschiedenen Nanopartikeln (Abbildung 4.91 a). Die Erhöhung der DNA Konzentration brachte hier keine Verbesserung der Schicht. In Abbildung 4.91 b zeigt sich eine Verschlechterung der Schicht. Es wurden nur vereinzelt Partikel abgeschieden. Ein Problem bei der Abscheidung mit einer DNA > 50 Basenpaare war die Stabilität der Dispersion. Die Dispersion wurde destabilisiert und neigte zum schnellen Flocken.

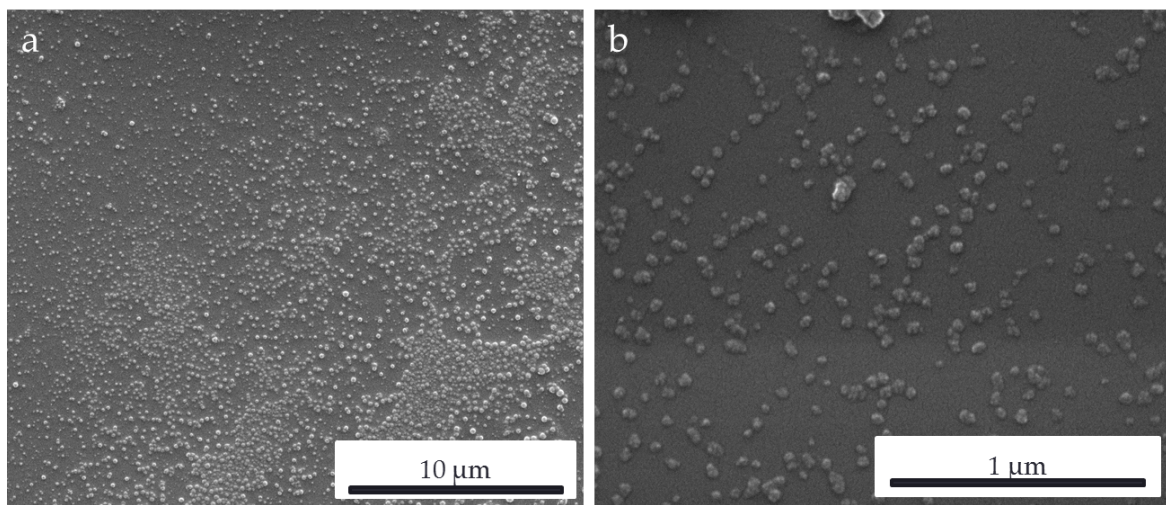


Abbildung 4.91.: REM-Aufnahme von abgeschiedenen biofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln; a) Heringssperma-DNA > 50 Basenpaare, Konzentration: $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, Abscheidezeit: 25 min, Abcheidespannung 2V, b) Heringssperma-DNA > 50 Basenpaare, Konzentration: $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, Abscheidezeit: 20 min, Abscheidespannung 2 V.

H. Urch zeigte in seiner Dissertation, dass DNA-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol überführt werden konnten.^[6] Die anschließende elektrophoretische Abscheidung erzielte keine durchgängige Schicht, sondern Inseln, die auf dem Substrat abgeschieden wurden. Ein weiteres Problem dabei war die Stabilität der erhaltenen Dispersion. Die Dispersion neigte zur Ausbildung von Agglomeraten, so dass für die elektrophoretische Abscheidung nur ein geringes Zeitfenster blieb.

4.4.3.1. Stabilität der abgeschiedenen Schicht

Für Zelltests wurde die Stabilität der Schicht getestet. Es wurde eine Schicht von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln elektrophoretisch auf Silicium abgeschieden. Eine REM-Aufnahme der abgeschiedenen Schicht ist in Abbildung 4.92 gezeigt. Es wurden sieben beschichtete Proben für 48 h in 1 mL Reinstwasser gelegt. Die Bedingungen wurden so festgelegt, wie bei einem Zelltest. Nach 48 h wurden die Proben mittels UV/Vis Spektroskopie untersucht.

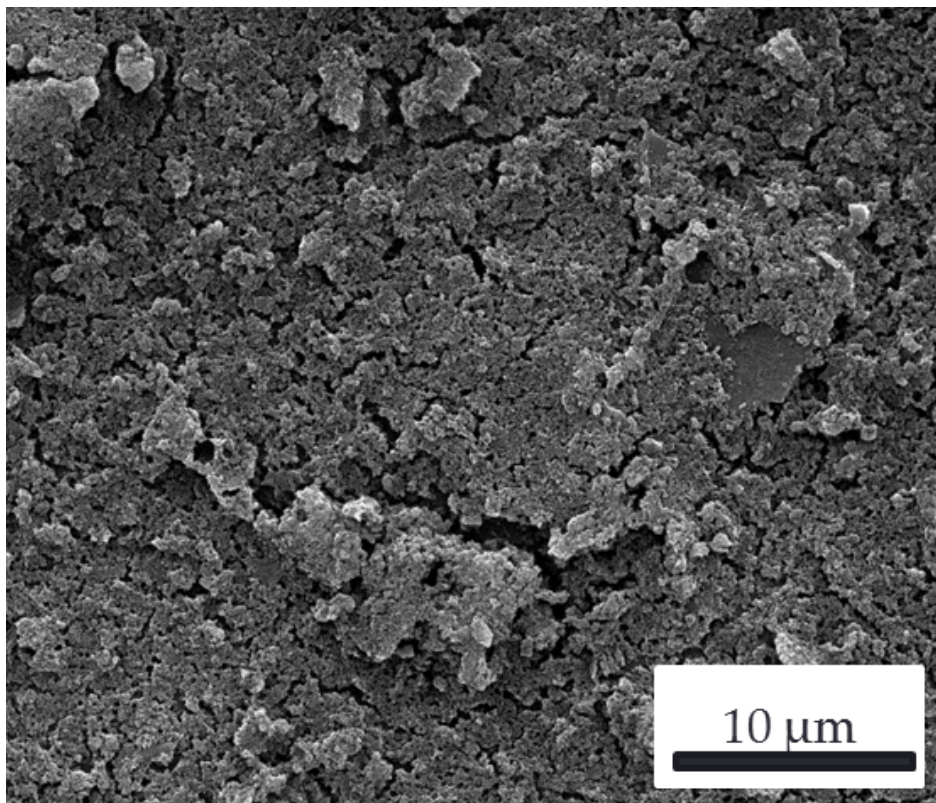


Abbildung 4.92.: REM-Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln abgeschieden, aus Isopropanol bei 50 V für 1 min.

Die spektroskopischen Untersuchungen zeigten eine sehr geringe Anzahl der Partikel in der Lösung (Abbildung 4.93). Nach dem Abtrocknen der Substrate zeigte sich, dass die Schichten noch intakt waren. Eine Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte keine Partikel im Überstand, was auf eine zu geringe Anzahl der Partikel in der Lösung zurückzuführen war.

4. Ergebnisse und Diskussion

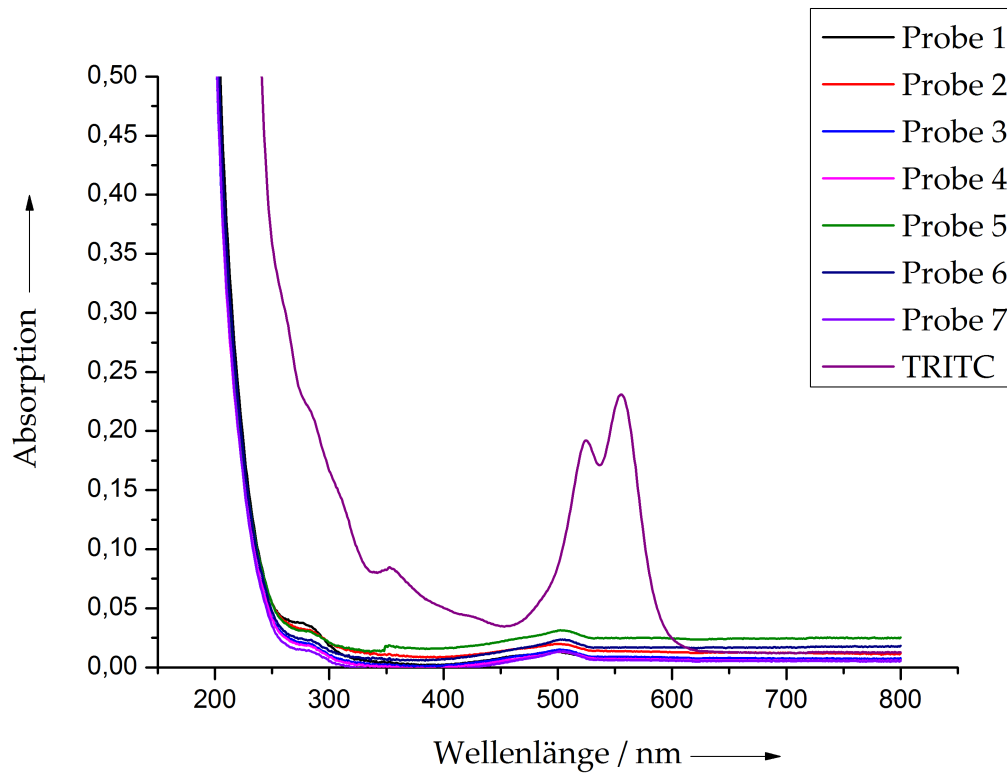


Abbildung 4.93.: UV-Messung des Wasserüberstands nach einlegen der beschichteten Substrate für 48 h.

Die Schichten waren für Zelltests geeignet. Die Schicht zeigte eine gute Stabilität gegenüber Flüssigkeiten.

4.4.4. Bestimmung der Schichtdicke

Für spätere Versuche ist es wichtig die Schichtdicke der Abscheidung zu bestimmen. Für die Bestimmung wurden Silicium-Substrate unter verschiedenen Bedingungen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln beschichtet. Um die Schichtdicke zu bestimmen, wurde jeweils von fünf Silicium-Substraten je Abscheidebedingung die Calciummenge in der Elementaranalyse bestimmt. Über den Calciumgehalt wurden die Schichtdicken auf den Silicium-Substraten wie folgt berechnet:

Der Durchmesser des Kerns der Nanopartikel ist im Durchschnitt 100 nm, $r = 50 \text{ nm} = 5 \cdot 10^{-8} \text{ m}$, die Dichte von Hydroxylapatit (HAP) ist $\rho (\text{HAP}) = 3160 \text{ kg m}^{-3}$.

$$V = 4/3 \pi r^3 \quad (4.1)$$

$$m(\text{proPartikel}) = V\rho \quad (4.2)$$

Die Masse des Calcium wurde mittels AAS bestimmt, die Größe der Si-Substrate ist auf 1 cm^2 normiert. Die mittels AAS bestimmten Calciummengen müssen durch zwei dividiert werden, da die Schichtdicke für eine Seite bestimmt werden soll. Der Massenanteil des Calciums in HAP betrug:

$$w(\text{Ca}) = \frac{5 \cdot M(\text{Ca})}{M(\text{HAP})} = 0,398 \quad (4.3)$$

mit

$$M(\text{Ca}) = 40 \text{ g mol}^{-1}$$

$$M(\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}) = 502 \text{ g mol}^{-1}$$

$$\frac{m(\text{HAP})}{A} = \frac{m(\text{Ca})}{w(\text{Ca})} / 1 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 \quad (4.4)$$

Mit Formel 4.4 kann die Masse von HAP pro Fläche (A) des Substrats errechnet werden. Wenn das Ergebnis aus Formel 4.4 durch das Ergebnis der Formel 4.2 dividiert wird, wird die Anzahl der Partikel pro m^2 errechnet.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Schichtdicke beträgt pro reinem HAP:

$$d(HAP) = \frac{m(HAP)}{A} / \rho(HAP) \quad (4.5)$$

In der Annahme, dass die Partikel sich in einer dichtesten Kugelpackung anordnen, wird eine Schichtdicke wie folgt errechnet:

$$\frac{V_{\text{Partikel}}}{V_{\text{total}}} = 0,74 \quad (4.6)$$

$$d = \frac{d(HAP)}{0,74} \quad (4.7)$$

Die berechneten Schichtdicken sind in den Tabellen 4.5, 4.6 und 4.7 dargestellt. Es zeigte sich, dass sich Multilagen bilden, wenn Partikel aus Isopropanol abgeschieden werden (Tabelle 4.5). Die Schichtdicke nahm von 30 s zu 120 s um das Doppelte zu, von anfänglich 2-3 Lagen auf 5-6 Lagen Nanopartikel. Es zeigte sich auch, dass die Schichtdicke in einem Bereich von 60 s bis 90 s gleich blieb und erst 30 s später weiter zunahm. Daraus ergab sich eine Abhängigkeit der Schichtdicke von der Zeit. Diese Abhängigkeit wurde allerdings nur für Abscheidungen mit Isopropanol ersichtlich. Im Vergleich dazu zeigten Abscheidungen mit Wasser redispergierbaren Partikeln keine Erhöhung der Schichtdicke durch eine Erhöhung der Zeit (Tabelle 4.6). Nach der Berechnung der Schichtdicke wurde ersichtlich, dass keine komplette Lage auf den Substraten abgeschieden wurde. Ein Grund dafür ist die Abscheidespannung, die nicht höher als 2 V gewählt werden konnte, da eine Elektrophorese des Wassers verhindert werden sollte. Alle aus Wasser abgeschiedenen Nanopartikel zeigten, dass keine kompletten Schichten abgeschieden werden konnten. Die nicht aufgereinigten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten allerdings eine Tendenz zu einer Erhöhung der Abscheiderate nach einer Zeiterhöhung (Tabelle 4.7). Die Schichtdicke war aber auch hier begrenzt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.5.: Berechnete Schichtdicke von Calciumphosphat-Nanopartikeln, abgeschieden aus Isopropanol bei einer Abscheidespannung von 50 V.

Abscheidezeit [s]	AAS Ergebnis (Ca) [mg]	Schichtdicke d [nm]	Partikel-lagen	Partikel pro μm^2
30	0,029	310	2-3	436
60	0,037	393	3-4	558
90	0,038	400	3-4	576
120	0,057	610	5-6	867

Tabelle 4.6.: Berechnete Schichtdicke von in Wasser redispergierbaren Calciumphosphat-Nanopartikeln, abgeschieden aus Wasser bei einer Abscheidespannung von 2 V.

Abscheidezeit [min]	AAS Ergebnis (Ca) [mg]	Schichtdicke d [nm]	Partikel pro μm^2
30	$2.06 \cdot 10^{-6}$	22	31
60	$1.33 \cdot 10^{-6}$	14	20
90	$1.37 \cdot 10^{-6}$	15	21
120	$1.30 \cdot 10^{-6}$	14	20

Tabelle 4.7.: Berechnete Schichtdicke von nicht aufgereinigten Calciumphosphat-Nanopartikeln, abgeschieden aus Wasser bei einer Abscheidespannung von 2 V.

Abscheidezeit [min]	AAS Ergebnis (Ca) [mg]	Schichtdicke d [nm]	Partikel pro μm^2
30	$1.24 \cdot 10^{-6}$	13	19
60	$2.48 \cdot 10^{-6}$	27	38
90	$1.95 \cdot 10^{-6}$	21	30
150	$2.88 \cdot 10^{-6}$	31	44

4. Ergebnisse und Diskussion

Bei der Verwendung wässriger Medien während der elektrophoretischen Abscheidung sind viele Parameter wichtig, um ein gutes Abscheide-Ergebnis zu erhalten. Ein gutes Ergebnis hängt von der elektrischen Feldstärke, der Abscheidezeit, der Partikelkonzentration, dem Elektrodenabstand sowie dem Flächenverhältnis ab. Die Gegenelektroden-Fläche hat einen großen Einfluss auf das Abscheideergebnis. Zhao et al. postulierten, dass eine größere Gegenelektroden-Fläche eine stärkere Polarisierung verursacht, was zu einer Erhöhung der abgeschiedenen Masse führt.^[163] Eine zu große Fläche führt allerdings zu groben Schichtoberflächen, während zu kleine Gegenelektroden-Flächen eine geringe Abscheide-Effizienz haben, was sich in dünnen und unebenen Schichten zeigt.^[163] Dieser Einfluss zeigte sich auch bei den Abscheidungen aus Wasser, die in dieser Arbeit gezeigt wurden. Durch die zu kleine Gegenelektroden-Fläche bildeten sich keine vollständigen Schichten auf den Si-Substraten aus.

4.4.4.1. Theoretische Berechnung der Schichtdicke

Eine weitere Möglichkeit bietet die theoretische Berechnung der Schichtdicke. Das Zetapotential der Partikel wurde mittels Zetapotentialmessungen bestimmt. Mit dem erhaltenen Wert war es möglich, die elektrophoretische Mobilität μ_e zu berechnen. Die Berechnung erfolgte über die Gleichung von Henry 2.6. Für den Henry Faktor $f(\kappa a)$ wurde der Wert 1,5 eingesetzt, da in einem wässrigen Medium gemessen wurde. Daraus ergab sich für die elektrophoretische Mobilität ein Wert von $1.812 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ Vs}^{-1}$. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel ließ sich mit folgender Gleichung berechnen:

$$v = \mu_e E \text{ mit } E = \frac{U}{d} \quad (4.8)$$

Die Gleichung der elektrischen Feldstärke E geht von der Annahme aus, dass sich die Kathode und Anode wie zwei Kondensatorplatten verhalten. Mit einer Spannung von 50 V und einem Plattenabstand von 0,005 m ergab sich eine Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel von $1.812 \cdot 10^{-18} \text{ m s}^{-1}$. Bei einer Abscheidezeit von 30 s wanderten die Partikel $5.436 \cdot 10^{-3} \text{ m}$. Die Si-Substrate, die für die Abscheidungen verwendet wurden, hatten eine Größe von 1 cm^2 . Mit einer Partikelkonzentration von 1 mg mL^{-1} in der Ausgangslösung ergab sich für die Abscheidung eine Menge von 0,544 mg Partikeln, die in 30 s den Si-Substrate erreichen können. Die Masse

4. Ergebnisse und Diskussion

eines Partikels ließ sich mit der Dichte von HAP $3,2 \text{ g cm}^{-3}$ und dem Durchmesser von 100 nm berechnen, daraus ergab sich eine Masse von $1,65 \cdot 10^{-18} \text{ kg}$ pro Partikel. Mit der Masse pro Partikel berechnet sich für das gesamte Volumen, das in 30 s abgeschieden werden kann, eine Partikelanzahl von $3,29 \cdot 10^{15} \text{ Partikel m}^{-2}$. Pro μm^2 ergibt sich eine Partikelanzahl von 3290 Partikel pro m^2 für eine Abscheidezeit von 30 s.

Im Vergleich zur tatsächlich abgeschiedenen Partikelanzahl (siehe Tabelle 4.5) ergab sich eine höhere theoretische berechnete Anzahl an abgeschiedenen Partikel. Dieser Unterschied ließ sich auf verschiedene Faktoren zurückführen. Es wurden verschiedene fehlerhafte Annahmen getroffen, z.B. wurde die elektrophoretische Mobilität in einer wässrigen Dispersion bestimmt und nicht im späteren Abscheidemedium Isopropanol. Der Plattenabstand ist ebenfalls eine Fehlerquelle, da der Abstand manuell eingestellt wird. Zur Berechnung der Partikelmasse pro Partikel wurde die Dichte von HAP verwendet, während die Nanopartikel wahrscheinlich eine geringere Dichte besitzen. Es war nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, was während der elektrophoretischen Abscheidung passierte. Es war nicht bekannt, wie viele Partikel sich während der Abscheidung von der Silicium-Oberfläche wieder ablösen. Des Weiteren veränderte sich während der Abscheidung das elektrische Feld um das Si-Substrat, da sich nach und nach Partikel auf der Oberfläche abschieden.

4.4.4.2. Zusammenfassung

Bei der elektrophoretischen Abscheidung von Nanopartikeln zeigte sich eine Abhängigkeit der abgeschiedenen Schicht von ihren Parametern. Die größten Abhängigkeiten zeigten sich bei der Abscheidezeit, dem verwendeten Medium, der Abscheidespannung und der Größe der Elektrode. Die verwendeten Partikel zeigten ebenfalls einen Einfluss auf die Abscheidung. Je länger die Abscheidezeit gewählt wurde, umso dicker war die erhaltende Schicht. Die gewählte Spannung hatte einen Einfluss auf die Dauer der Abscheidung. Die Spannung für wässrige Medien wurde auf 2 V reduziert, um eine Elektrophorese des Wassers zu vermeiden. Durch diese Verringerung der Abscheidespannung musste die Zeit der Abscheidung erhöht werden, um genügend Partikel abscheiden zu können. Partikel, die in Isopropanol abgeschieden wurden, konnten mit einer Spannung von 50 V abgeschieden werden. Die Abscheidezeit konnte dabei reduziert werden. Bei einer Abscheidedauer

4. Ergebnisse und Diskussion

von 30 s werden 436 Partikel pro μm^2 abgeschieden. Wenn die Zeit erhöht wurde, erhöhte sich auch die Schichtdicke. Ab einer Abscheidezeit von 2 min erhielt man eine Schichtdicke von 867 Partikel pro μm^2 . Diese Ergebnisse wurden mit Abscheidungen mit einer kleinen Anode erzielt. Solche Ergebnisse konnten mit Abscheidungen aus wässrigen Medien nicht erreicht werden. Die Partikelschichten waren hierbei inhomogen und nicht über die gesamte Fläche vorhanden. Es konnte dabei auch kein Trend festgestellt werden. Eine Erhöhung der Abscheidezeit brachte hier auch keine Verbesserung der Schichten. Eine Änderung der Anodengröße zeigte eine Änderung in der abgeschiedenen Schicht. Es wurden mehr Partikel abgeschieden als vorher. Durch die Änderung der Anodengröße konnte auch die Abscheidezeit reduziert werden. Bei der Änderung des Abscheidesubstrats zeigte sich auch eine Änderung im Abscheideverhalten. Die Verwendung einer rauen Oberfläche (Ti-Substrat) hat zur Folge, dass die Partikel besser an der Oberfläche anhaften, für diese Versuche wurden wiederum eine kleine Anode benutzt. Hier zeigte sich, dass eine Erhöhung der Zeit auch mit wässrigen Medien eine Verbesserung der Schichten zur Folge hatte. Es konnten dabei homogene Schichten abgeschieden werden (Abbildung 4.71). Die Abscheideversuche mit dem kontinuierlichen Flussreaktor zeigten keine Verbesserung der abgeschiedenen Schicht. Es zeigte sich, dass sich vermehrt Agglomerate auf den strukturierten Bereichen abgeschieden hatten, während sich auf dem unstrukturierten Silicium und Titan eine inhomogene Schicht an Nanopartikeln abgeschieden hatte.

Für spätere Transfektionsversuche wurden die Parameter ermittelt, um optimale Schichten mit biofunktionalisierten Nanopartikeln zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass die Größe der DNA einen Einfluss auf die Abscheidung hatte. Des Weiteren wurde deutlich, dass die adsorbierte DNA die Abscheidung ebenfalls beeinflusst. Bei der Erhöhung der DNA-Konzentration von $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ auf $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (DNA < 50 Basenpaare) zeigte sich bei gleichen Abscheidebedingungen, dass eine dichtere Monolage abgeschieden wurde. Mit einer DNA von > 50 Basenpaare konnten nur inhomogene Schichten abgeschieden werden, eine Änderung der DNA-Konzentration oder der Abscheidezeit brachte keine Verbesserung der abgeschiedenen Schicht. Versuche zur Festigkeit der Schicht für die Zellversuche zeigten, dass die Schicht eine gute Stabilität gegenüber Flüssigkeiten aufwies.

4.5. Besiedlung von nanostrukturierten Oberflächen

Nanoprodukte sind in der Medizin aktuell von großer Bedeutung. Die Beschichtung von Implantaten mit Nanopartikeln soll zu einer besseren Anhaftung von Zellen an der Implantatoberfläche und dadurch zu einer besseren Verwachsung mit dem Knochen führen. Die Beschichtung mit Calciumphosphat hat den Vorteil, dass Osteoblasten, knochenbildende Zellen, gut an der Implantatoberfläche anhaften, da es ein Knochenersatzmaterial darstellt.^[164] Untersuchungen mit Titanfilmen zeigten, dass eine Strukturierung in einem Nanometerbereich von 2 bis 20 nm keinen Einfluss auf die Zellproliferation haben.^[165] Daraus kann man schlussfolgern, dass die Strukturen eine bestimmte Größe aufweisen müssen, um zelluläre Funktionen zu beeinflussen. Strukturierungen von Polyurethan in einem Bereich von 150 bis 600 nm zeigten eine bessere Differenzierung von humanen Stammzellen als auf unstrukturierten Substraten.^[166] Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass die Oberflächenbeschaffenheit eine wichtige Rolle in Bezug auf das Zellverhalten spielt.^[167–169] Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass das verwendete Material von geringerer Bedeutung ist.^[170] Die wichtigsten Eigenschaften des Materials sind hier seine gute Biokompatibilität sowie seine hydrophile Oberfläche. In diesem Abschnitt soll auf die Zellbesiedlung von nanostrukturierten Oberflächen eingegangen werden, dabei soll ermittelt werden, wie Zellen auf diese Art der Nanostrukturierungen reagieren.

Eine der häufigsten Methoden Oberflächen zu strukturieren ist die Lithographie. Es gibt verschieden Arten der Lithographie: Die optische Lithographie, Photolithographie, Soft Lithographie, Dip-Pen Nanolithographie und die Nanoimprint Lithographie.^[171] Die Nachteile der Lithographie sind ihre hohen Kosten sowie die Begrenzung des Auflösungsvermögens. Die Begrenzung entsteht durch die Wellenlänge der verwendeten Strahlung.^[172] Eine weitere Möglichkeit ist die Nanostrukturierung mit linearen polarisierten Femtosekunden-Laserpulslen.^[173] Die Herstellung so genannter *ripples* kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Die Aufteilung erfolgt in *low spatial frequency* (LSF) *laser-induced periodic surface structures* (LIPSS) und *high spatial frequency* LIPSS (HSFL). Der Unterschied lässt sich an der Periodizität fest machen, bei LSFL liegt die Periodizität im Bereich der verwendeten Wellenlänge, während bei HSFL die Periodizität weit unterhalb der Wellenlänge liegt.^[174] Für diese Arbeit wurden die strukturierten Silicium-(Si)-Substrate für Zelluntersuchungen mit HSFL strukturiert.

4.5.0.3. Nanostrukturierung und Zellbesiedlung

Die in dieser Arbeit verwendeten nanostrukturierten Silicium-Substrate wurden am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert von der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmermann hergestellt. Für die Herstellung wurde ein Titan/Saphir Laser mit einer Anregungswellenlänge von 800 nm verwendet. Die Pulsdauer beträgt 140 fs, die Wiederholungsrate ist 80 MHz, die Energie pro Puls beträgt 40 nJ.^[175] Abbildung 4.94 zeigt die entstandenen LIPPS, die Strukturen lassen sich bis zu einer Größe von 1 cm² herstellen. Diese Größe wird durch die Aneinanderreihung von kleineren Felder erreicht, die Kantenlänge der Felder beträgt 230 µm. Die entstandenen *ripples* weisen eine Periodizität von 110 nm auf. Teilweise sind die Strukturen noch durch den Abtrag der Laserstrukturierung verdeckt (siehe Bild 4.94 a).

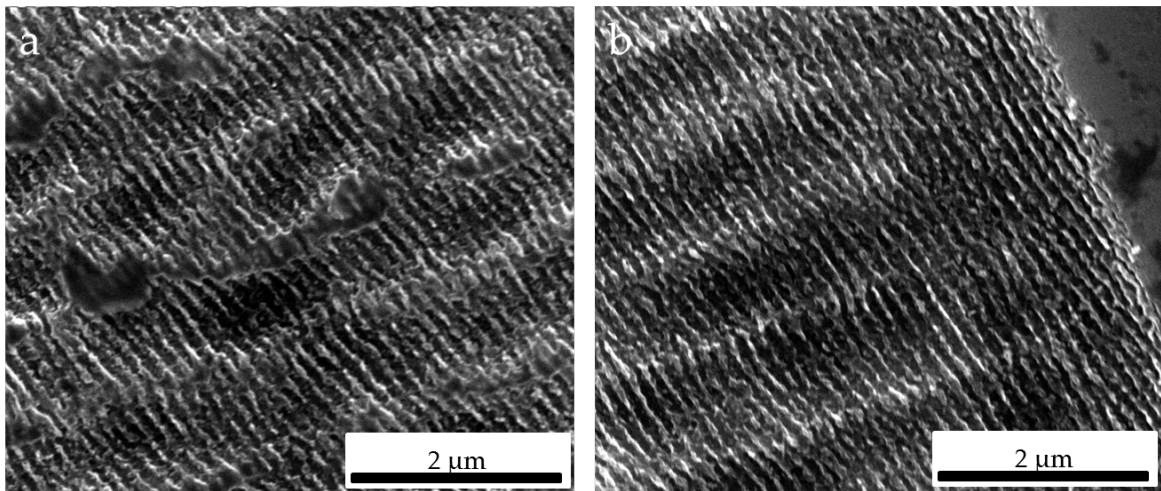


Abbildung 4.94.: REM-Aufnahme von einer *ripple* Struktur, hergestellt mit HSFL.

Die Besiedlung der nanostrukturierten Si-Substraten wurden ebenfalls im Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert durchgeführt. Die Strukturierung wurde in einem Schachbrettmuster angeordnet, jedes Feld hat dabei eine Kantenlänge von 230 µm. Die Kultivierungsdauer mit Mausfibroblasten (L929-Zellen) betrug 48 h. Anschließend wurden die Zellen mit einer aufsteigenden Alkoholreihe auf dem Substrat fixiert. In Abbildung 4.95 sieht man die Besiedlung der Substrate mit L929-Zellen. Die hellen Bereiche sind nanostrukturiert, während die dunklen Felder unstrukturiert sind. Auf diesen REM-Aufnahmen sah man eine Präferenz der Zellen für die unstrukturierten Bereiche. Auf den strukturierten Bereichen waren im

4. Ergebnisse und Diskussion

Durchschnitt 80 ± 36 Zellen mm^{-2} angesiedelt, auf den unstrukturierten Bereichen 228 ± 48 Zellen mm^{-2} . Der Unterschied lag in der Größenordnung von 1:3 (strukturiert:unstrukturiert). In Abbildung 4.96 ist eine L929-Zelle auf einem strukturierten Bereich dargestellt. Für jede Messreihe wurde jeweils ein Dreifachtest durchgeführt. Um Einflüsse vom Ätzen mit NH_4/HF auszuschließen, wurden Vergleichstests mit unstrukturierten Substraten durchgeführt, diese wurden genauso behandelt wie die strukturierten Substrate. Außerdem wurden die gleichen Versuche mit Substraten durchgeführt, die vorher mit O_2 -Plasma aktiviert worden waren, dadurch wurde eine veränderte Benetzbarkeit der Oberfläche erreicht. Es zeigten sich die gleichen Ergebnisse für alle Proben sowohl mit als auch ohne Plasmabehandlung. Der Vergleichstest der mit NH_4/HF behandelten und unbehandelten Substrate zeigte keinen Unterschied in der Zellbesiedlung. Der Unterschied in der Zellbesiedlung, der sich nach 48 h zeigte, scheint ein natürlicher Struktureffekt zu sein, dessen Wirkung für verschiedene Oberflächenchemie beobachtbar war.

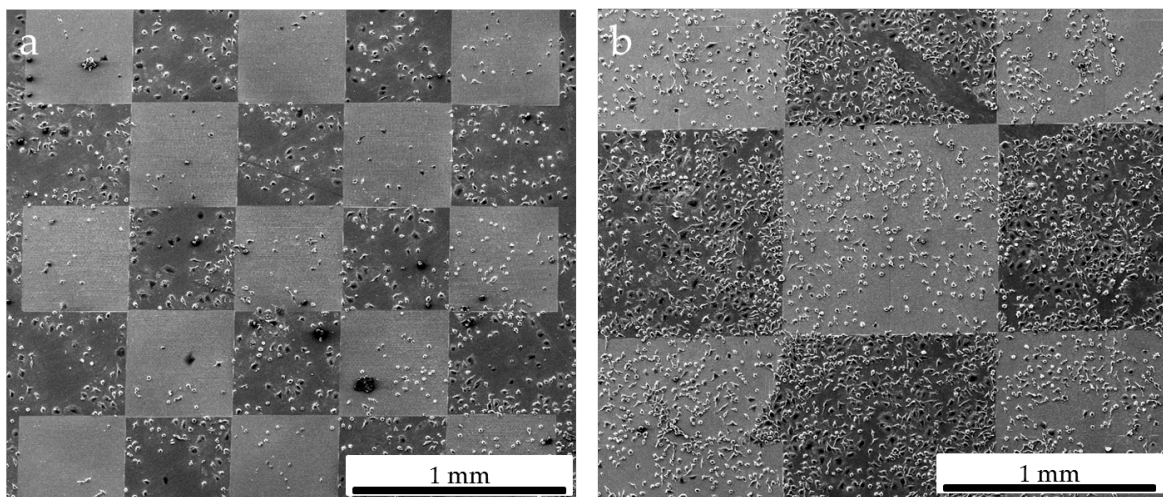


Abbildung 4.95.: Kultivierung von L929-Zellen auf strukturierten und unstrukturierten Bereichen, von Silicium in unterschiedlichen Vergrößerungen.

4. Ergebnisse und Diskussion

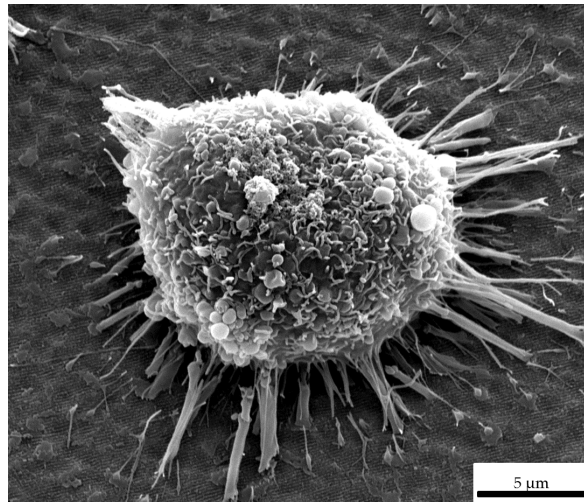


Abbildung 4.96.: REM-Aufnahme einer L929-Zelle auf einem strukturierten Bereich.

Die Besiedlung von nanostrukturierten Oberflächen, die mit Calciumphosphat-Nanopartikel beschichtet wurden, zeigte eine sehr gute Adhäsion der Zellen an das nanostrukturierte Substrat. Diese Substrate wurden für 48 Stunden mit Epithelzellen (HeLa-Zellen) besiedelt. Die Fixierung der Zellen erfolgte ebenfalls über eine aufsteigende Alkoholreihe. In Abbildung 4.97 a und b ist zu sehen, dass die Zellen sehr gut an dem nanostrukturierten Substrat adhärieren. Im Vergleich dazu sieht man auf Bild 4.97 c, dass die Zelle auf dem unstrukturierten Bereich weniger expandiert war. Das lag daran, dass dort keine bzw. nur sehr wenige Calciumphosphat-Partikel abgeschieden wurden. Das letzte Bild zeigt, dass sich nur geringfügige Proteinablagerungen in den *ripple* Strukturen ablagern. Hierbei musste auch berücksichtigt werden, dass die Proben vor der Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop mehrfach gewaschen wurden. Dadurch kann es zu einer Veränderung der Oberflächenmorphologie kommen. Die Besiedlung der Oberfläche mit HeLa-Zellen wurde von Frau Dr. Anna Kovtun durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

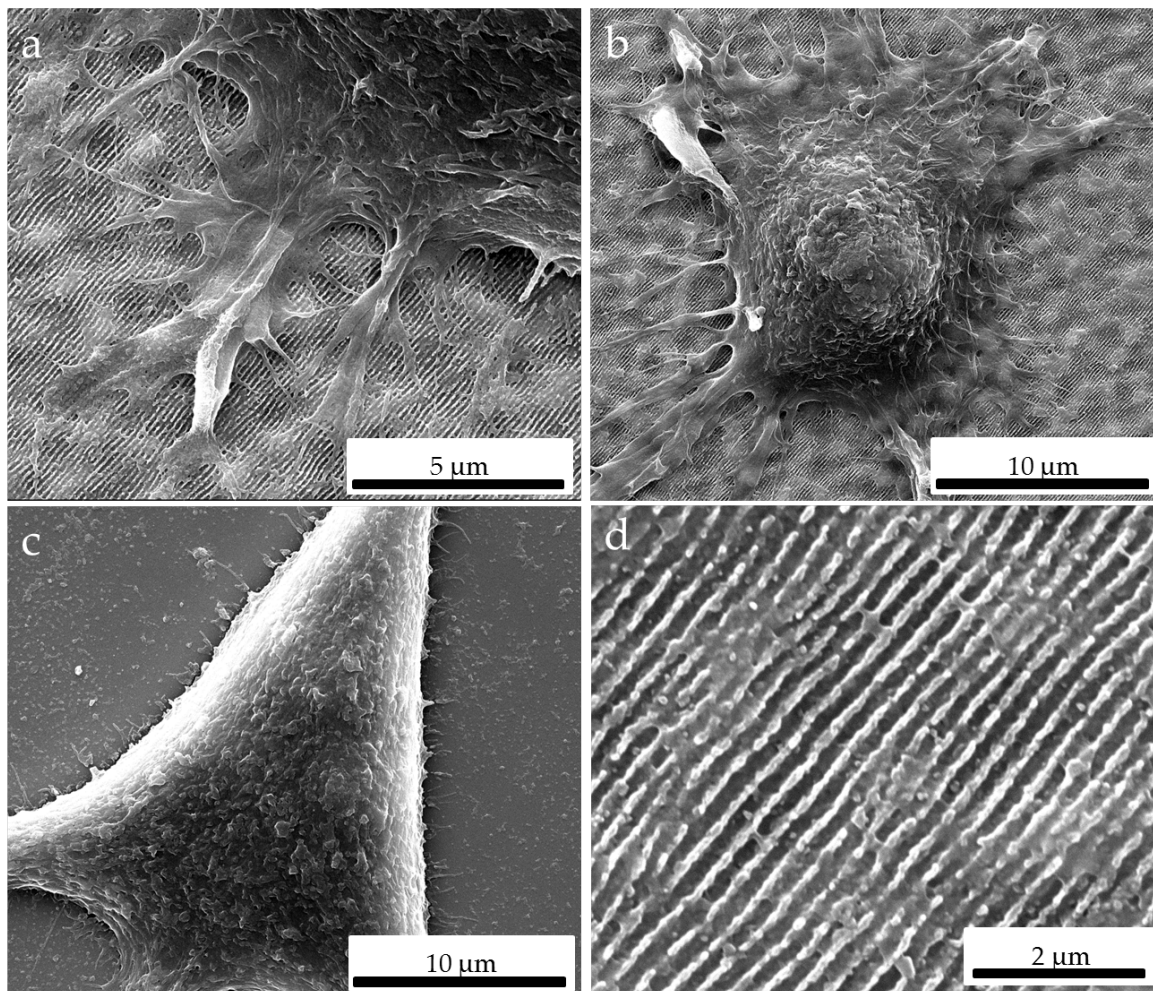


Abbildung 4.97.: Ergebnisse der Besiedlung von Calciumphosphat beschichteten Nanostrukturen mit HeLa-Zellen.

4.5.0.4. Zusammenfassung

Die Zellbesiedlung von nanostrukturierten Oberflächen zeigte eine Präferenz der Zellen für unstrukturierte Bereiche. Die Strukturen wurden in einem Schachbrettmuster in ein Si-Substrat aufgebracht. Das Auszählen der Zellen auf den Substraten ergab folgendes Ergebnis. Auf den strukturierten Bereichen waren im Durchschnitt 80 ± 36 Zellen mm^{-2} angesiedelt, auf den unstrukturierten Bereichen 228 ± 48 Zellen mm^{-2} . Nach einer Beschichtung der Substrate mit Calciumphosphat-Nanopartikeln zeigte sich nach Zellversuchen mit HeLa-Zellen eine gute Adhäsion der Zellen auf den strukturierten Bereichen. Auf den unstrukturierten Bereichen, wo sehr wenige Partikel abgeschieden wurden, waren die Zellen weniger expan-

diert. Eine Beschichtung mit Calciumphosphat-Nanopartikeln übte einen positiven Einfluss auf die Adhäsion der Zellen aus.

4.6. Zellaufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln

Bei der elektrophoretischen Beschichtung von Si-Substraten kommt es häufig zu Abscheidungen von Nanopartikeln in Multilagen. Um zu ermitteln, ob „vergrabene“ Schichten von Partikeln von Zellen aufgenommen werden können, wurden Versuche mit zwei verschiedenen fluoreszenzmarkierten Calciumphosphat-Nanopartikeln durchgeführt. Für die Zellaufnahme von fluoreszierenden Nanopartikeln wurden Si-Substrate mit zwei verschiedenen Lagen von Calciumphosphat-Nanopartikeln beschichtet. Die Beschichtungen wurden aus Alkohol durchgeführt. Die Besiedlung der Substrate erfolgte anschließend mit HeLa Zellen. Die Zellversuche wurden von Frau Diana Kozlova durchgeführt. Nach sieben Stunden wurde das erste Mal das Medium gewechselt. Die Inkubationszeit der Zellen wurde variiert, die Ablösung der Zellen von den Substraten erfolgte nach drei unterschiedlichen Zeitintervallen. Das Trypsinieren und Ausplattieren wurde nach 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt. Alle Proben wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die Abscheidedauer pro Partikellage betrug 1 min, die verwendete Spannung betrug 50 V, die erste abgeschiedene Lage bestand aus CaP/PEI/TRITC-Nanopartikeln (rot). Nach dem Trocknen der ersten Lage wurde unter denselben Bedingungen eine Lage CaP/PEI/FITC-Nanopartikel (grün) abgeschieden. In Abbildung 4.98 ist der schematische Aufbau der Lagen dargestellt. Abbildung 4.99 zeigt die abgeschiedene Doppelschicht. In Kapitel 4.4.4 wurde berechnet, wie dick eine aus Isopropanol abgeschiedene Lage nach 1 min Abscheidedauer war. Für jede Lage ergibt sich eine Schichtdicke von 393 nm, das entspricht drei bis vier Partikellagen. Durch die zweite Abscheidung ergab sich eine Gesamtdicke der Partikel auf dem Si-Substrat von ca. 800 nm. Das bedeutet, die Zellen haben die Möglichkeit, ca. 1200 Partikel pro μm^2 aufzunehmen. Durch die zweite Schicht sollte die erste Schicht „vergraben“ werden. Die ersten Ergebnisse nach 24 h zeigten, dass die Zellen nur wenige Partikel aufgenommen haben. Allerdings ist auch zu erkennen, dass beide Arten von fluoreszierenden Partikeln aufgenommen wurden (Abbildung 4.100).

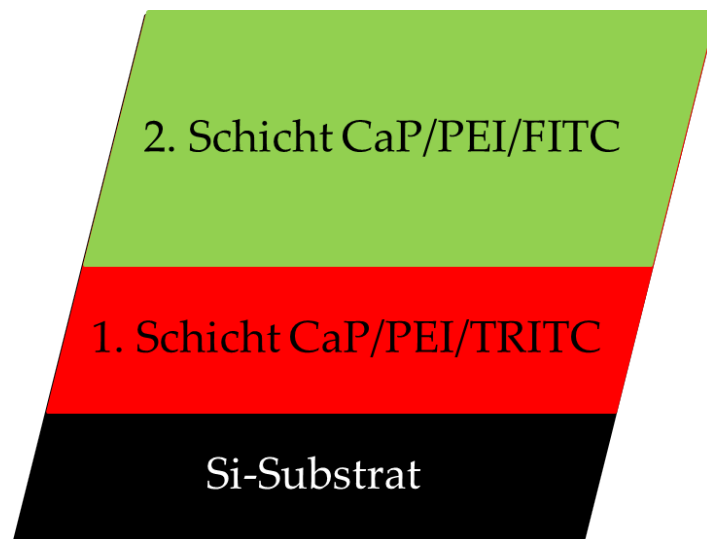


Abbildung 4.98.: Schematische Darstellung der nacheinander abgeschiedenen fluoreszierenden CaP/PEI/TRITC- (rot) und CaP/PEI/FITC-Nanopartikeln (grün).

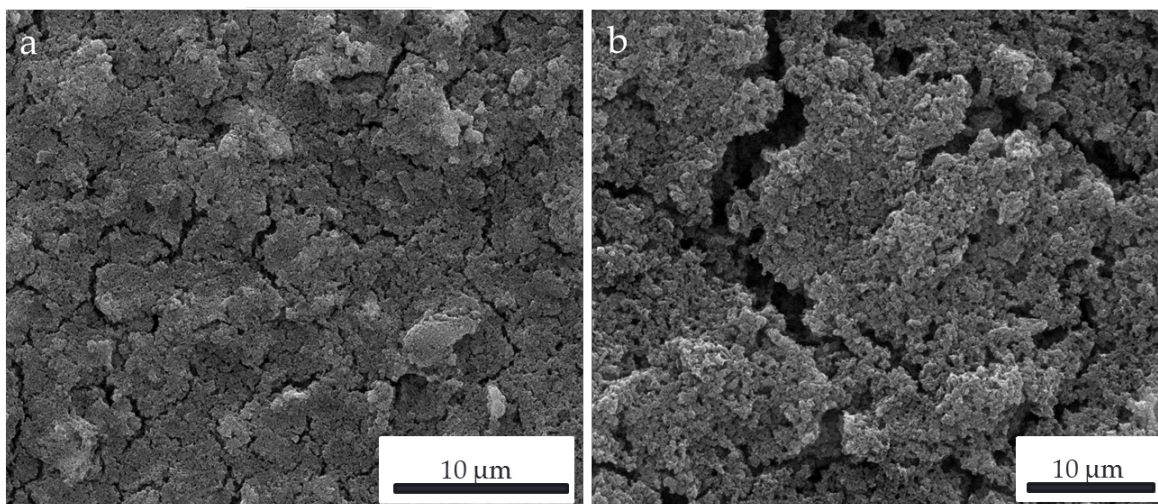


Abbildung 4.99.: REM-Aufnahme von nacheinander abgeschiedenen fluoreszierenden CaP/PEI/TRITC- und CaP/PEI/FITC-Nanopartikeln.

Wenn die Inkubationszeit der Zellen auf den Partikeln um weitere 24 h erhöht wird, ergibt sich ein ganz anderes Bild. Die Aufnahme von Nanopartikeln durch die Zellen hatte sich stark erhöht (Abbildung 4.101). Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Partikeln, es wurden zum größten Teil beide Arten von Partikeln aufgenommen.

4. Ergebnisse und Diskussion

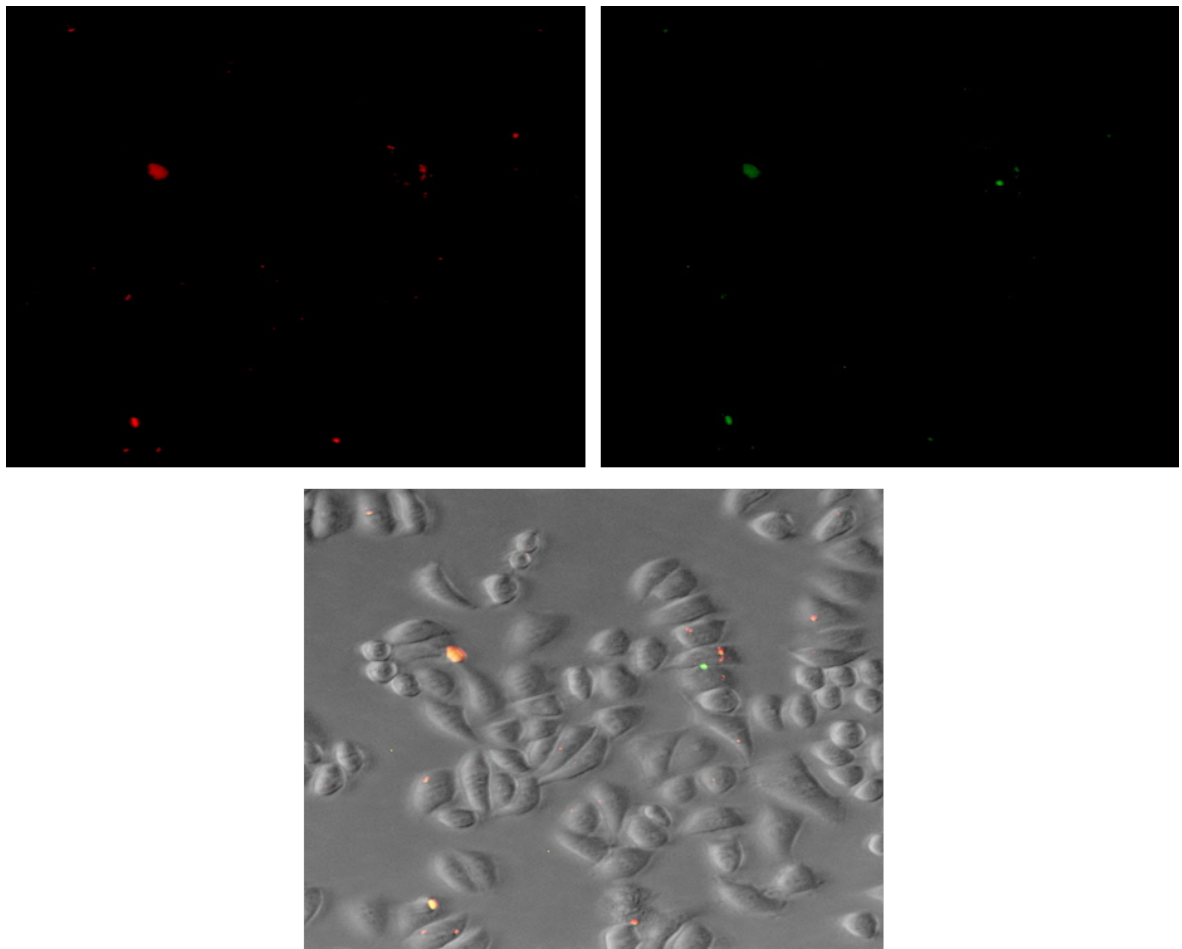


Abbildung 4.100.: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von HeLa-Zellen nach der Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln nach 24 h.

Nach den bisher erhaltenen Ergebnissen lag die Vermutung nahe, dass nach einer weiteren Erhöhung der Inkubationszeit noch mehr Partikel durch die Zellen aufgenommen werden. Die Erhöhung der Inkubationszeit auf 72 h zeigte allerdings, dass die Partikelaufnahme wieder absinkt (Abbildung 4.102). Durch die Erhöhung der Zeit war es den Zellen möglich, die schon aufgenommenen Partikel aufzulösen und das Calcium durch die Calciumkanäle aus der Zelle wieder hinaus zu pumpen. Deshalb war keine weitere Erhöhung der Partikelaufnahme zu verzeichnen. In Abbildung 2.2 ist zu erkennen, warum jeweils beide Arten von Partikeln aufgenommen wurden. Die tiefen Risse in den Lagen, die durch die Trocknung entstehen, legen die zweite Schicht für die Zellen frei, so dass diese auch sehr gut für die Zellen zu erreichen waren. Da Trocknungsrisse nie ganz vermieden werden können, war es für die Zellen möglich, auch unterschiedliche Partikel aus zwei übereinander abgesetzten Lagen aufzunehmen.

4. Ergebnisse und Diskussion

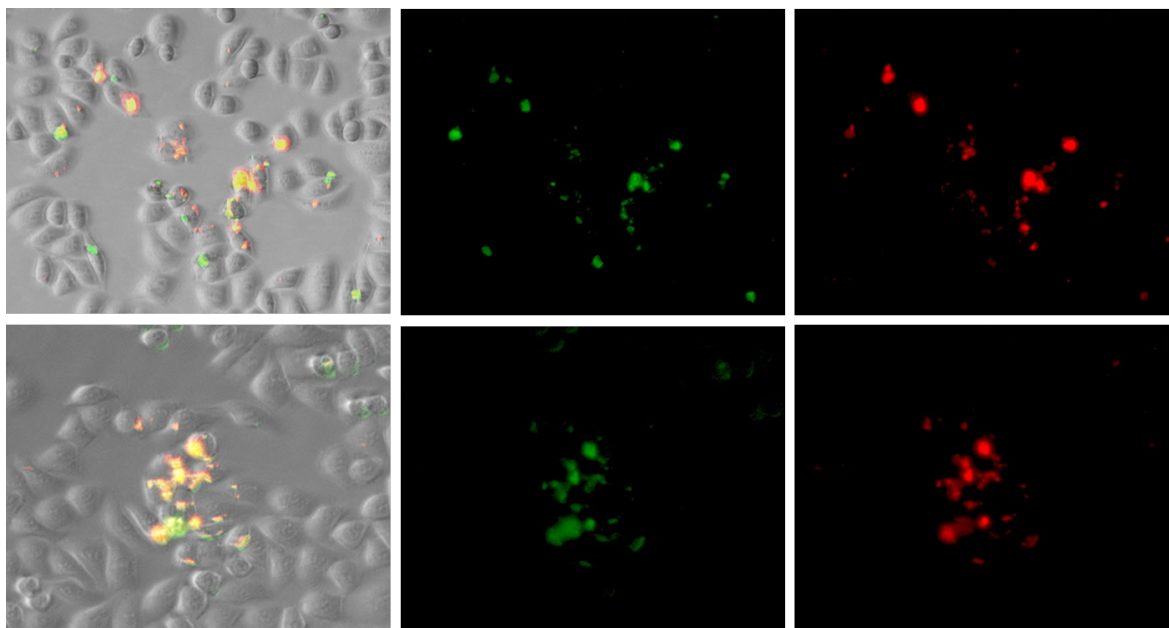


Abbildung 4.101.: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von HeLa-Zellen nach der Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln nach 48 h.

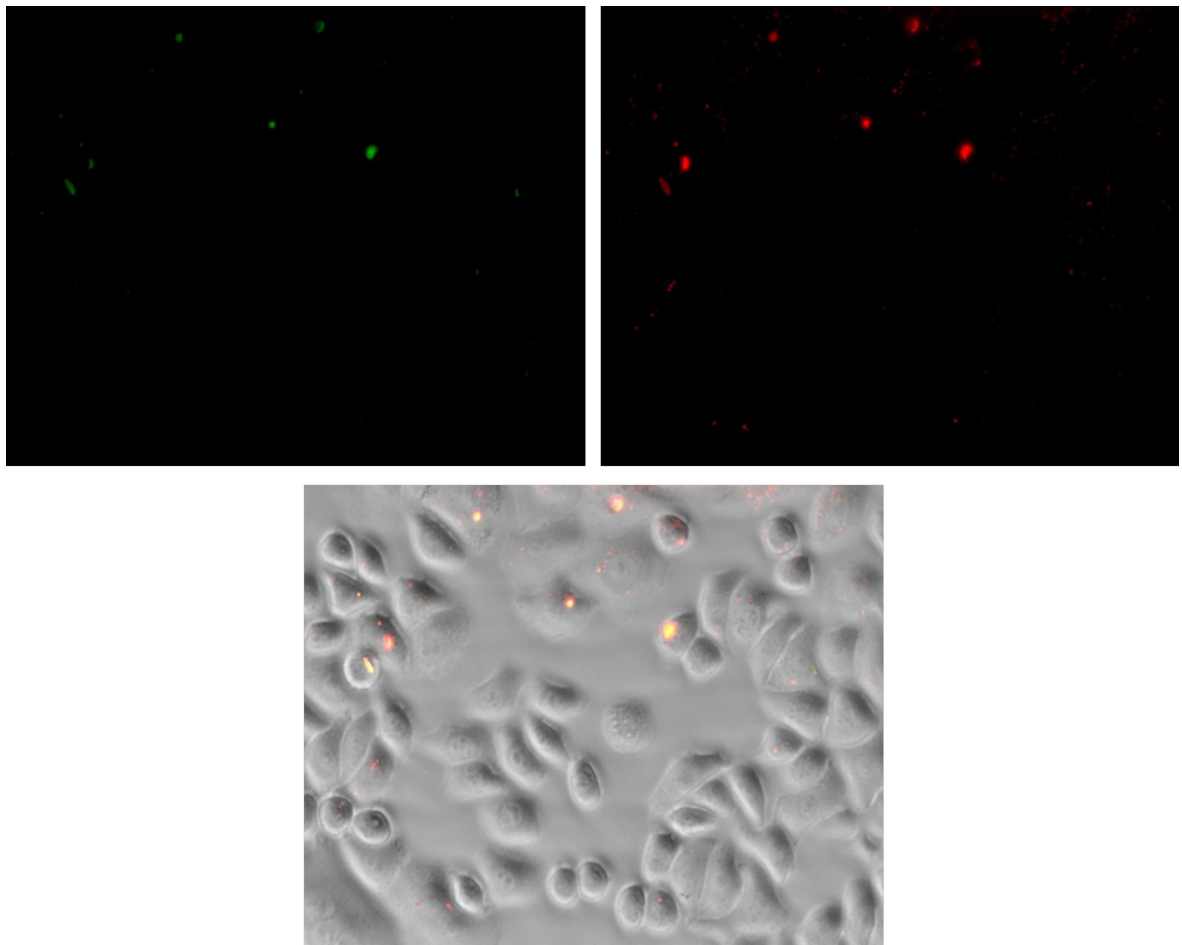


Abbildung 4.102.: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von HeLa-Zellen nach der Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln nach 72 h.

4.6.0.5. Zusammenfassung

Die Untersuchung der Zellaufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln zeigte eine Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Zellen. Nach 24 h wurden nur wenige Partikel von den Zellen aufgenommen. Eine Inkubationszeit von 48 h lieferte die maximale Partikelaufnahme der Zellen. Ein Absinken der Partikelaufnahme konnte nach 72 h festgestellt werden. Die Abnahme ist bedingt durch das Auflösen der Partikel in den Zellen. Das Calcium wird von den Zellen durch Calciumkanäle wieder aus der Zelle hinaus gepumpt. Dadurch konnten weniger Partikel in den Zellen gefunden werden. Bei diesen Versuchen wurden Schichten mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen übereinander abgeschieden. Es sollte festgestellt werden, ob die Partikel nur die eine Lage oder die Lagen nacheinander auf-

4. Ergebnisse und Diskussion

nehmen. Es wurde gezeigt, dass die Zellen immer beide Arten von Partikeln aufgenommen hatten. Das könnte an den entstandenen Trocknungsrisen liegen, die bei einer bestimmten Dicke der Schicht größer werden. Durch diese Risse war es möglich, dass die Zellen beide Partikellagen erreichen und diese dann gleichzeitig aufnehmen konnten. Das „Vergraben“ einer Schicht ist durch das Aufbringen einer weiteren Schicht Nanopartikel nicht ohne Weiteres möglich, da Trocknungsrisse nie ganz zu vermeiden sind. Für das „Vergraben“ einer Schicht müssen andere Wege als das hier untersuchte Verfahren gefunden werden, z.B. das Aufbringen einer Polymerschicht.

4.7. Transfektion von Oberflächen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen. Für die Transfektion von Oberflächen werden Oberflächen mit einer transfizierenden Schicht beschichtet. Diese Schicht kann aus verschiedenen Stoffen bestehen. In diesem Abschnitt wird auf die chemische Transfektion eingegangen. Diese erfolgt mit anorganischen Nanopartikeln, Lipofektion oder kationischen Polymeren. Calciumphosphat-Nanopartikel eignen sich besonders gut als DNA-Trägermaterial. Für die Beschichtung von Oberflächen müssen die verwendeten Nanopartikel eine Oberflächenladung aufweisen. Die Oberflächenladung erhalten sie mit einer gezielten Funktionalisierung mit einem Polymer. Polymere sind auch in der Lage, Zellen zu transfizieren. PEI ist ein Polymer, welches DNA gut komplexieren kann und wird deshalb sehr häufig für die Transfektion eingesetzt.^[119,176] Mit der elektrophoretischen Beschichtung ist es möglich, transfizierende Oberflächen zu erhalten. Diese Oberflächen können auf Implantaten eingesetzt werden, dadurch ist es möglich, gezielt Gentherapie zu betreiben.

Für die Transfektion von Oberflächen wurden ITO-Substrate mit einer Größe von 1 cm^2 verwendet. Die ITO-Substrate wurden mit biofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln elektrophoretisch beschichtet. In einer 12-Well Platte wurden die Substrate mit HeLa-Zellen besiedelt. Nach 72 h wurden die Substrate mit einem Fluoreszenzmikroskop auf transfizierte Zellen untersucht. Um die Zellen auf ihre Transfektionsfähigkeit zu überprüfen, wurden die Zellen jeweils mit Lipofectamine als Vergleich transfiziert. Die Zellversuche wurden von Frau Diana Kozlova durchgeführt.

4.7.0.6. Transfektionsversuche mit aufgereinigten Partikeln

Die ersten Versuche wurden mit aufgereinigten Calciumphosphat-Nanopartikeln durchgeführt. Dafür wurden gefriergetrocknete Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol redispersiert und mit Wasser in einem Verhältnis von 2:3 verdünnt. An die Partikel wurde eine EGFP-DNA Konzentration von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ adsorbiert. Eine Erhöhung der DNA-Konzentration führte zu einer Destabilisierung der Dispersion und zu einer Flockung des Systems. Die elektrophoretische Abscheidung wurde bei einer Spannung von 2 V durchgeführt, die Abscheidezeit betrug 1 h. In Abbildung

4. Ergebnisse und Diskussion

4.103 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Transfektionsversuche gezeigt.

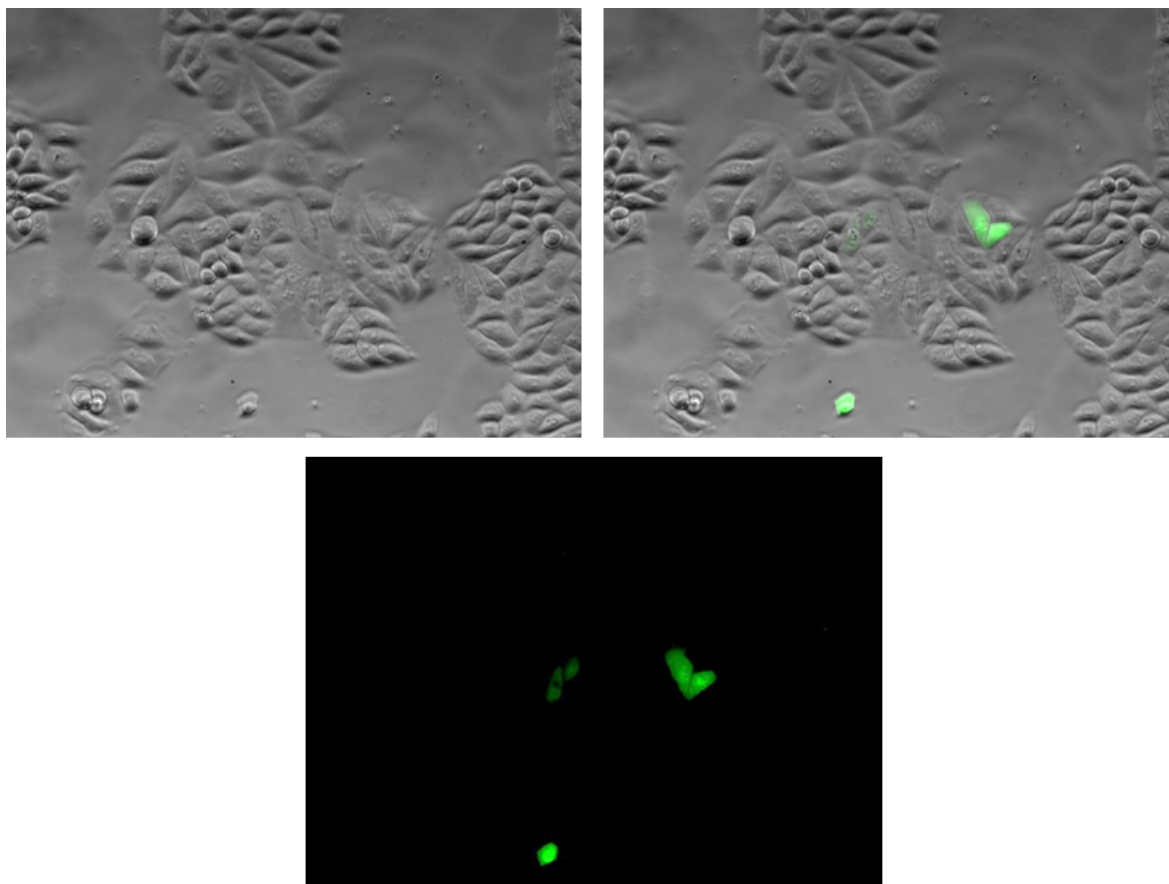


Abbildung 4.103.: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von einer mit HeLa Zellen besiedelten und mit CaP/PEI/EGFP-Nanopartikel beschichteten Oberfläche, die EGFP-DNA Konzentration betrug $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Die gezeigten Versuche wurden jeweils dreimal wiederholt. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurde die Transfektionseffizienz berechnet. In Abbildung 4.105 sind die berechneten Ergebnisse dargestellt. Die Transfektionseffizienz von Lipofectamin lag bei den Versuchen bei $65,5 \pm 18,5 \%$. Die Transfektionseffizienz der abgeschiedenen Partikel lag im Durchschnitt bei $5,3 \pm 0,6 \%$. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Tests bestimmt. Es zeigte sich, dass die Nanopartikel eine geringere Toxizität aufwiesen als Lipofectamin.

Die Transfektionseffizienz von aufgereinigten Partikeln ist auf 5 % begrenzt. Eine Erhöhung der Effizienz durch eine höhere DNA-Konzentration war nicht möglich,

4. Ergebnisse und Diskussion

da die Stabilität des Systems mit einer höheren DNA-Konzentration abnahm. Eine Veränderung der Abscheidparameter brachte auch keine Verbesserung der Transfektionseffizienz.

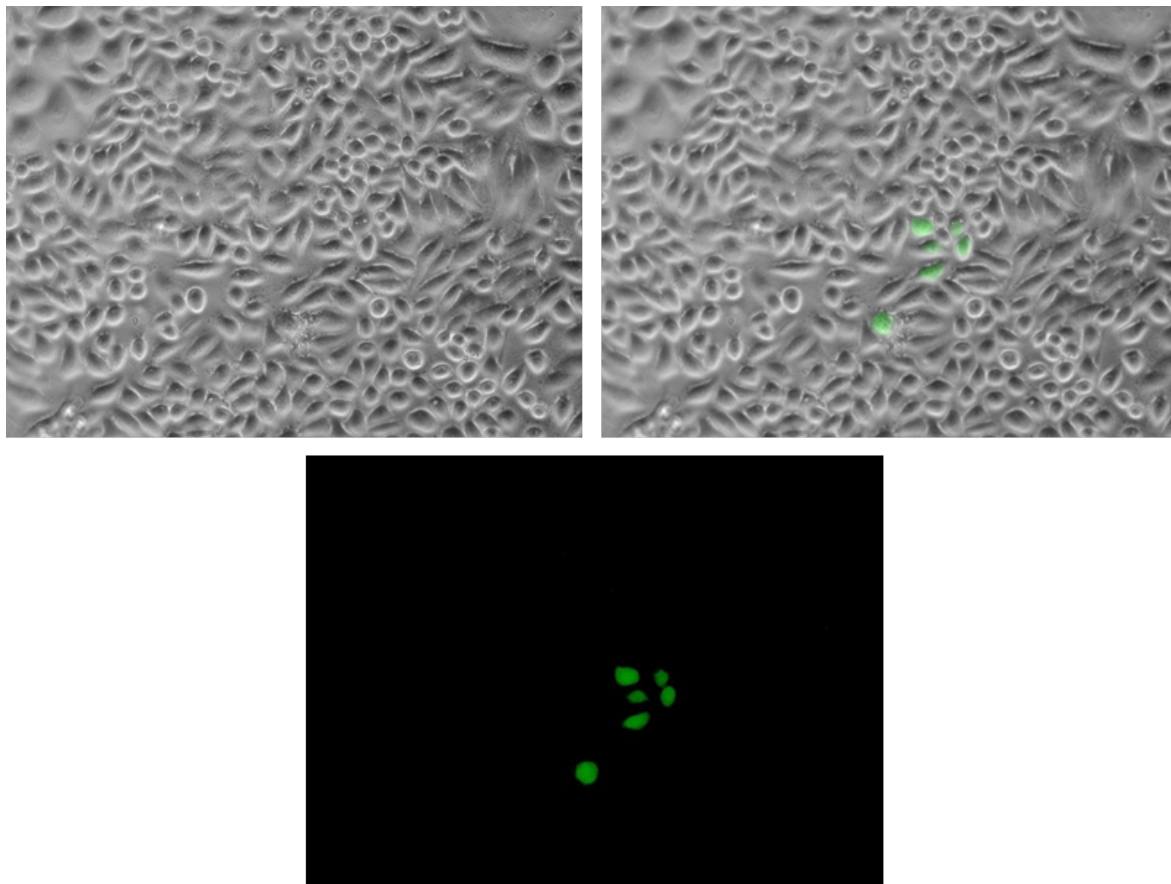


Abbildung 4.104.: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von einer mit HeLa Zellen besiedelten mit Wasser redispergierbaren CaP/PEI/EGFP-Nanopartikel beschichteten Oberfläche, die EGFP-DNA Konzentration betrug $25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Versuche mit in Wasser redispergierbaren Nanopartikeln zeigten eine maximale Transfektionseffizienz von 2 % (Abbildung 4.105). Da kein Ethanol in der Dispersion vorhanden war, war es möglich die EGFP-DNA Konzentration auf $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu erhöhen, ohne dabei die Dispersion zu destabilisieren. In Abbildung 4.104 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Transfektionsversuche dargestellt. Die Partikel wurden bei 2 V für 1 h auf ein ITO-Substrat abgeschieden.

4. Ergebnisse und Diskussion

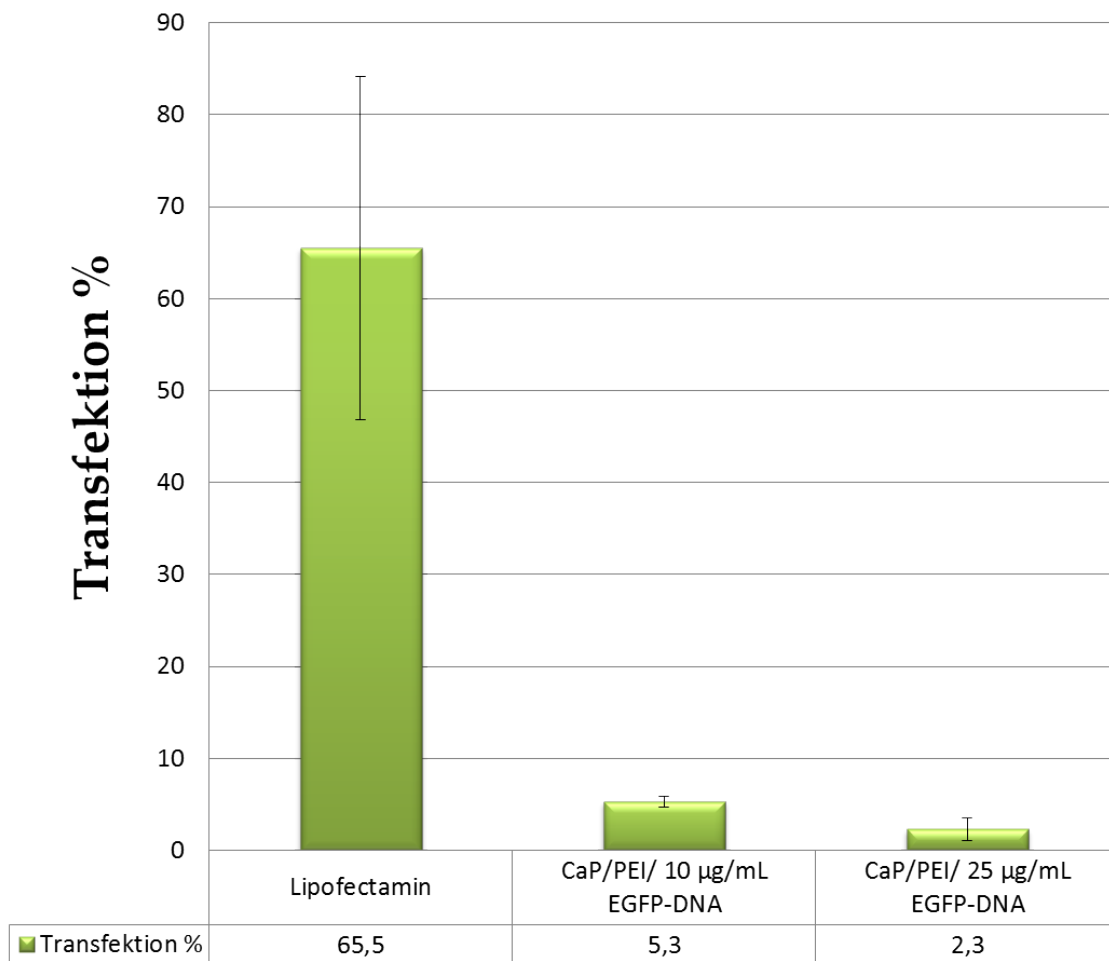


Abbildung 4.105.: Diagramm der Transfektionseffizienz von beschichteten Oberflächen mit aufgereinigten Partikeln mit einer DNA Konzentration von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ und von Wasser redispergierten Partikeln mit einer DNA Konzentration von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

In Abbildung 4.106 sind REM-Aufnahmen der elektrophoretischen Abscheidung von Wasser redispergierbaren Calciumphosphat-Nanopartikel zu sehen. Anhand dieser Bildern wird deutlich, dass sich die Morphologie der Partikel während der Abscheidung verändert hat. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die Transfektionseffizienz nicht weiter gesteigert werden konnte.

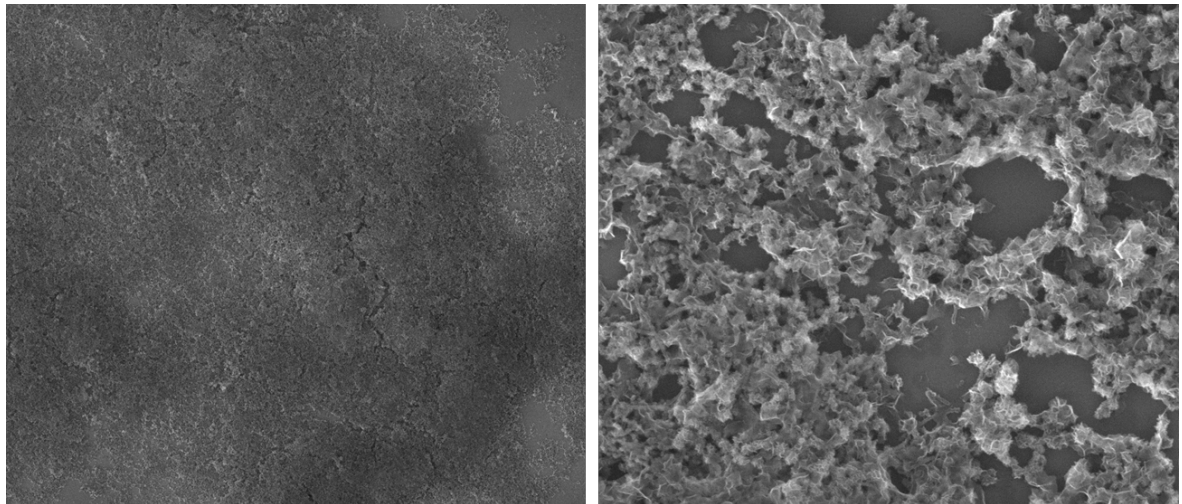


Abbildung 4.106.: REM-Aufnahme von Wasser redispergierbaren Calciumphosphat-Nanopartikeln nach der elektrophoretischen Abscheidung. Die Abscheidung wurde bei einer Spannung von 2 V für 1 h durchgeführt.

4.7.0.7. Transfektionsversuche mit nicht aufgereinigten Partikeln

Um eine Erhöhung der Transfektionseffizienz zu erreichen wurde das Partikel-System umgestellt. Die nachfolgenden Transfektionsversuche wurden mit Calciumphosphat-Nanopartikeln aus einer Wasservorlage durchgeführt (4.3.2). Die Partikel wurden für jeden Versuch frisch gefällt und mit verschiedenen Konzentrationen an EGFP-DNA versetzt. Es wurden EGFP-DNA-Konzentrationen von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ verwendet. Die Stabilität des Systems wurde durch die Erhöhung der DNA-Konzentration nicht gefährdet, da das System kein Ethanol enthielt. Die Abscheideparameter wurden für alle Versuche auf eine Spannung von 2 V und eine Abscheidedauer von 1 h festgelegt. In Abbildung 4.107 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Transfektionsversuchen mit einer EGFP-DNA Konzentration von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ gezeigt. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurde beobachtet, dass die Zellen sich vermehrt auf den mit Nanopartikeln beschichteten Flächen ansiedelten.

4. Ergebnisse und Diskussion

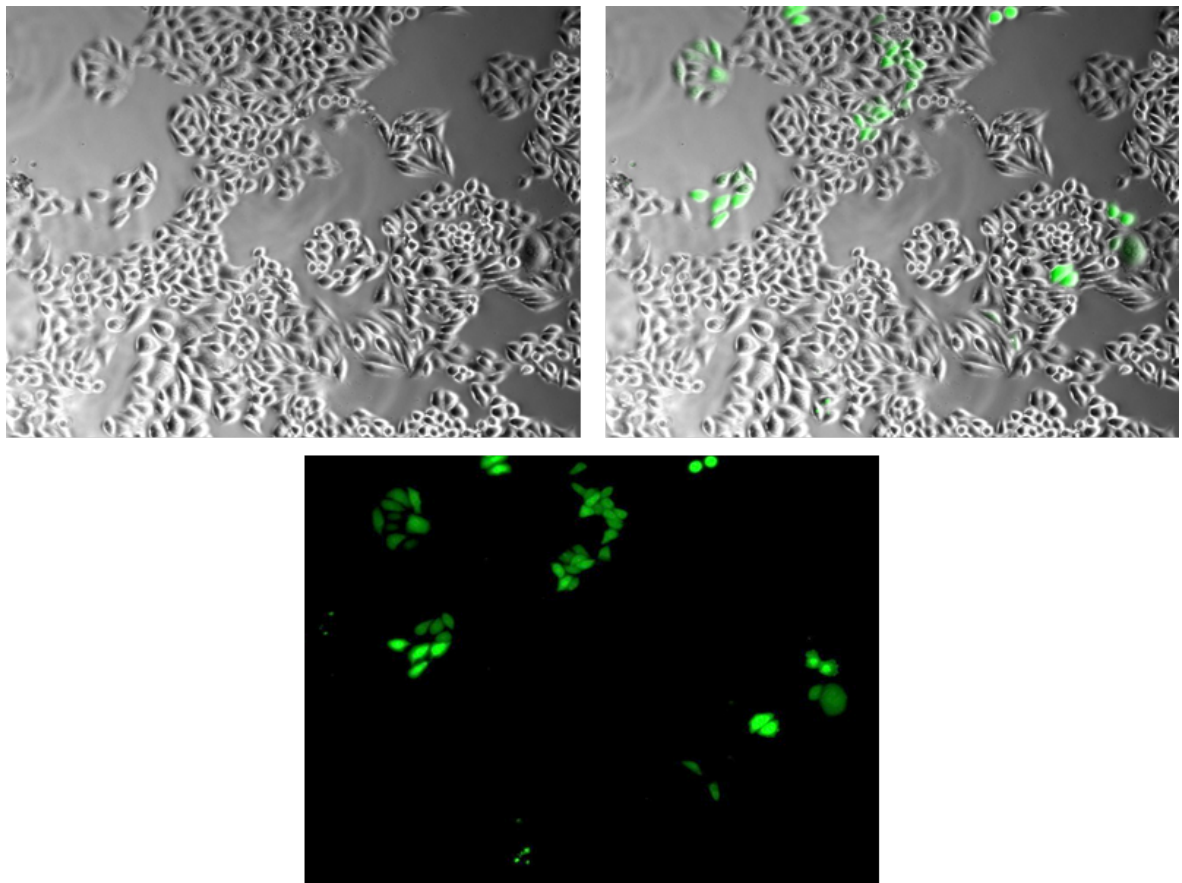


Abbildung 4.107.: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von einer mit HeLa Zellen besiedelten und mit CaP/PEI/EGFP-Nanopartikel beschichteten Oberfläche, die EGFP-DNA Konzentration betrug $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Alle gezeigten Versuche wurden jeweils mehrfach wiederholt. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurde die Transfektionseffizienz berechnet. In Abbildung 4.112 sind die berechneten Ergebnisse dargestellt. Die Transfektionseffizienz von Lipofectamin lag bei den Versuchen bei durchschnittlich $92 \pm 4 \%$. Die Transfektionseffizienz der abgeschiedenen Partikel mit einer EGFP-DNA Konzentration von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ lag im Durchschnitt bei $7,1 \pm 1,6 \%$. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Tests bestimmt. Es zeigte sich, dass die Nanopartikel eine geringere Toxizität aufwiesen als Lipofectamin.

Die nachfolgenden Abbildungen 4.108, 4.109, 4.110 und 4.111 zeigen Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von der Zellbesiedlung mit einer CaP/PEI/EGFP-Nanopartikel beschichteten Oberfläche mit einer EGFP-DNA Konzentration von 15, 25, 50 und $75 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4. Ergebnisse und Diskussion

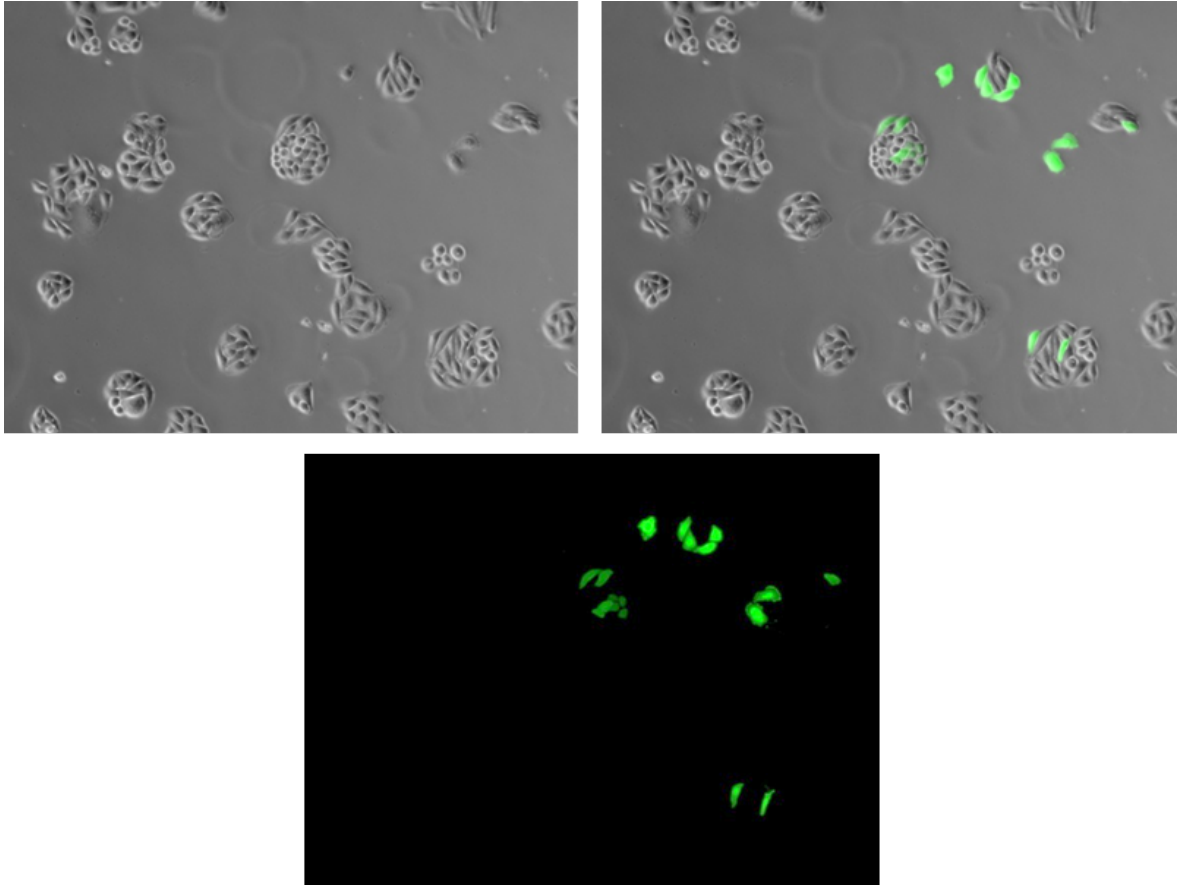


Abbildung 4.108.: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von einer mit HeLa Zellen besiedelten mit CaP/PEI/EGFP-Nanopartikel beschichteten Oberfläche, die EGFP-DNA Konzentration betrug $15 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4. Ergebnisse und Diskussion

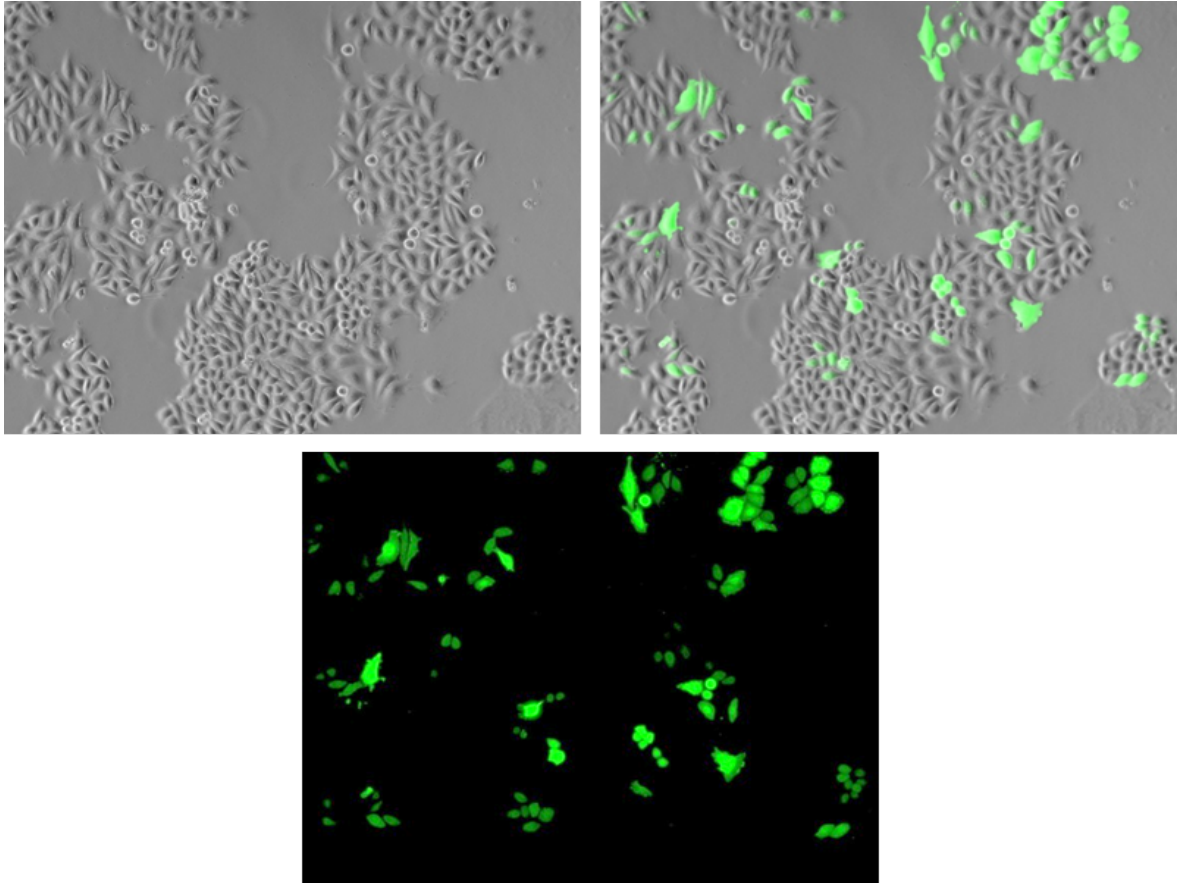


Abbildung 4.109.: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von einer mit HeLa Zellen besiedelten, mit CaP/PEI/EGFP-Nanopartikel beschichteten Oberfläche, die EGFP-DNA Konzentration betrug $25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4. Ergebnisse und Diskussion

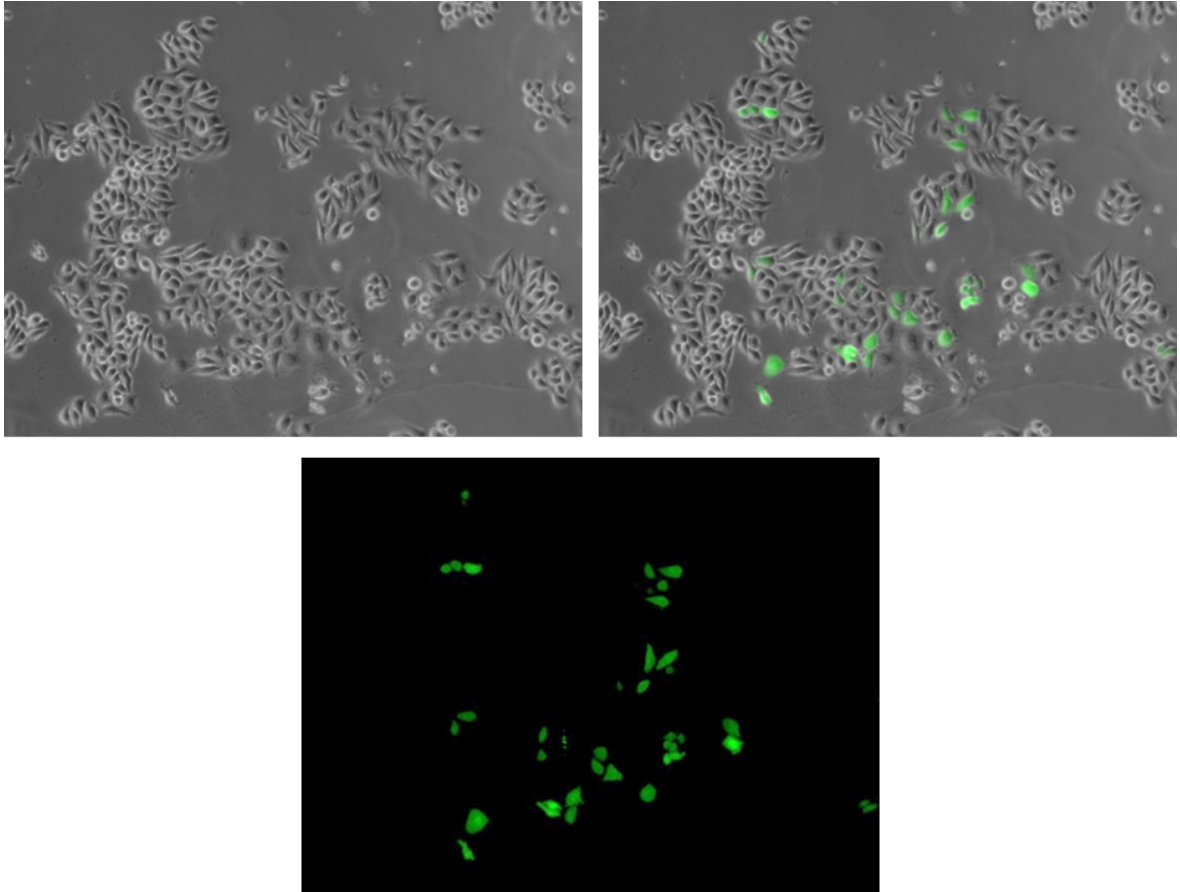


Abbildung 4.110.: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von einer mit HeLa Zellen besiedelten, mit CaP/PEI/EGFP-Nanopartikel beschichteten Oberfläche, die EGFP-DNA Konzentration betrug $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4. Ergebnisse und Diskussion

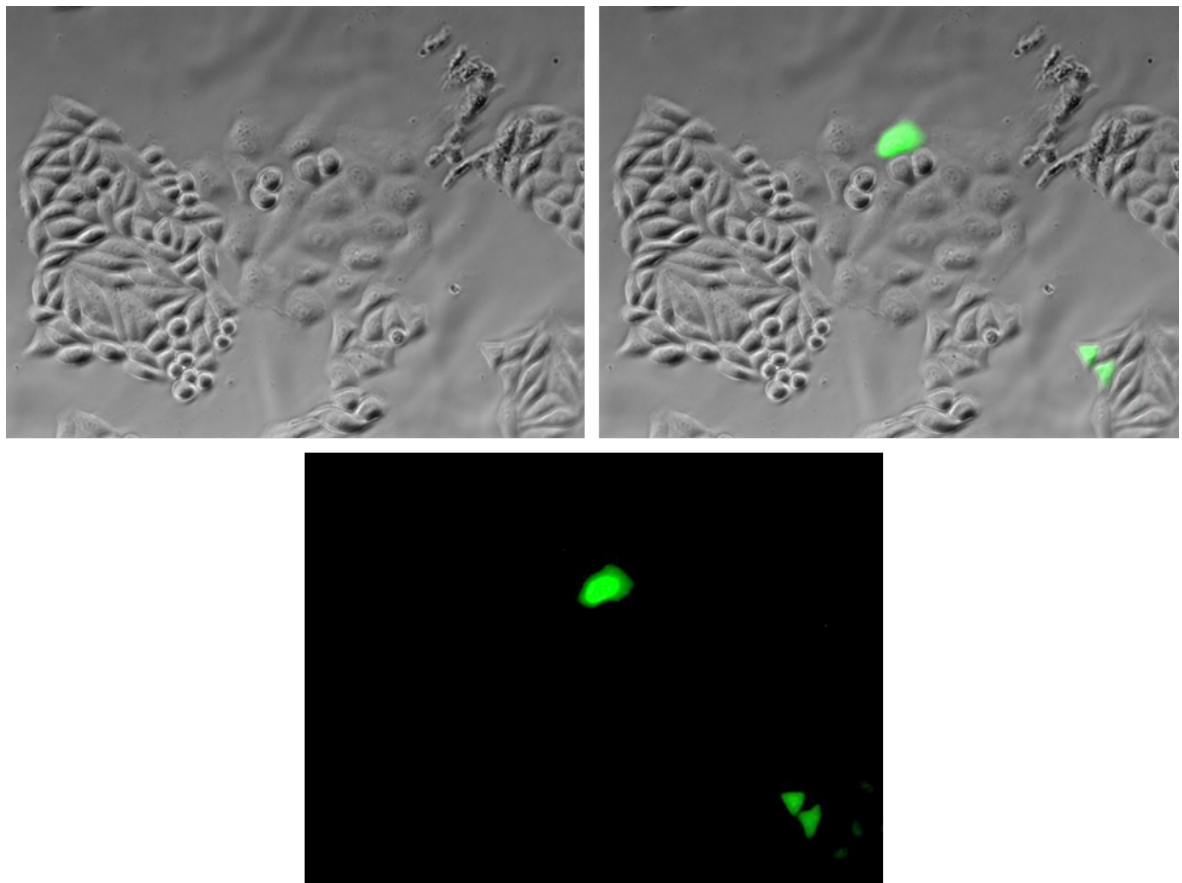


Abbildung 4.111.: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von einer mit HeLa Zellen besiedelten, mit CaP/PEI/EGFP-NP beschichteten Oberfläche, die EGFP-DNA Konzentration betrug $75 \mu\text{g mL}^{-1}$.

In Abbildung 4.112 sind die berechneten Ergebnisse der Transfektionseffizienzen gezeigt. Die Transfektionseffizienz von Lipofectamin lag bei den Versuchen bei durchschnittlich $92 \pm 4 \%$. Die Transfektionseffizienz der abgeschiedenen Partikel mit einer EGFP-DNA Konzentration von $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ lag im Durchschnitt bei $8 \pm 3 \%$. Für eine EGFP-DNA Konzentration von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ lag der Wert bei $12,0 \pm 5 \%$. Bei einer Konzentration von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ wird ein Scheitelpunkt erreicht. Die Transfektionseffizienzen, die ab einer höheren DNA-Konzentration bestimmt wurden, nahmen wieder ab. Bei einer DNA-Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ lag die Transfektionseffizienz bei $7,3 \pm 2,4 \%$. Diese Effizienz nahm noch weiter ab, bei einer DNA-Konzentration von $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ liegt die Effizienz bei $4,4 \pm 3,5 \%$. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Tests bestimmt. Es zeigte sich, dass die Nanopartikel eine geringere Toxizität aufwiesen als Lipofectamin.

4. Ergebnisse und Diskussion

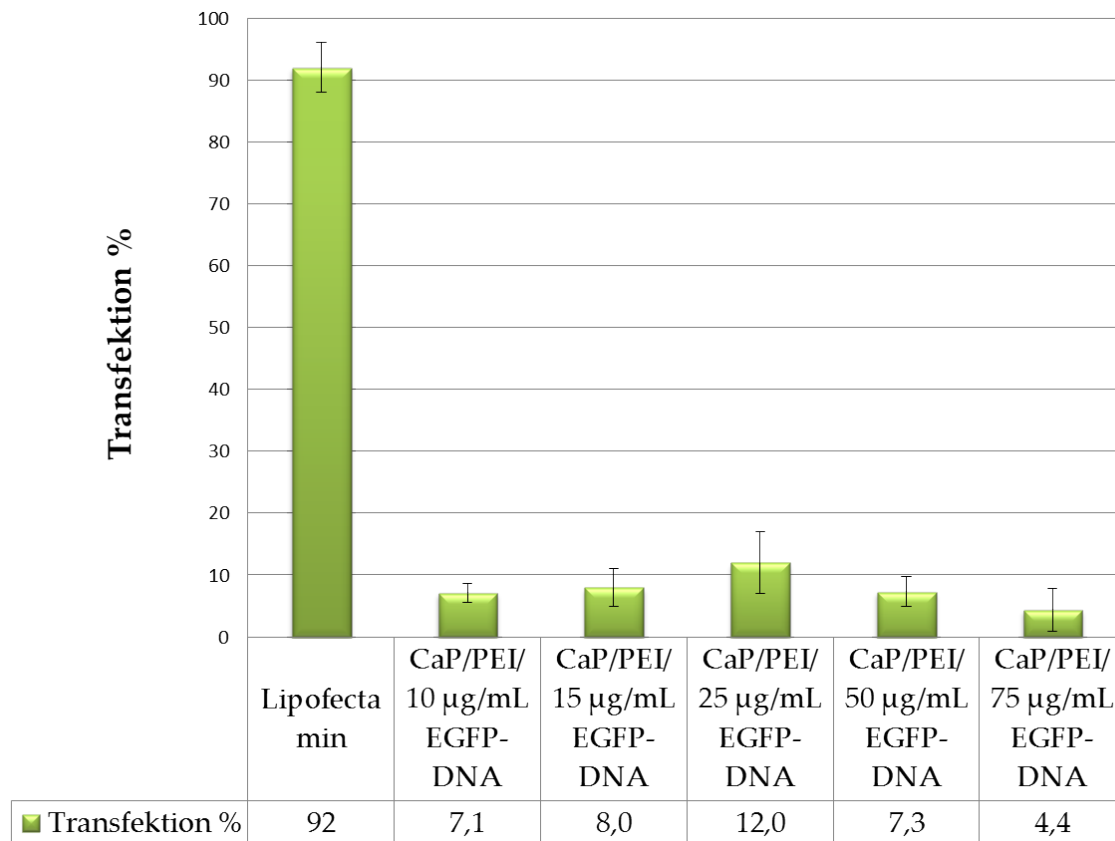


Abbildung 4.112.: Diagramm der Transfektionseffizienz von beschichteten Oberflächen mit einer EGFP-DNA Konzentration von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $75 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Mit nicht aufgereinigten Partikeln ist eine höhere Transfektionseffizienz erreichbar, als mit den aufgereinigten Partikeln. Hier liegt die maximale Transfektionseffizienz bei 12 %. Die Ursache für die höhere Transfektionseffizienz ist die Bildung von DNA-Polyplexen, da in der Dispersion noch überschüssiges Polymer vorhanden war, wenn die DNA zu den Partikeln gegeben wird. Diese Polyplexe wurden bei der elektrophoretischen Abscheidung ebenfalls abgeschieden. Polymerpolyplexe eignen sich sehr gut für die Transfektion von Zellen. Die Konzentration an Polyplexen lag hier unter der toxischen Grenze der Zellen. Zellversuche mit abgeschiedenen PEI-DNA-Polyplexen zeigten, dass diese ab einer erhöhten Konzentration zu einem erhöhten Zelltod führte.

H. Urch stellte in seiner Dissertation drei verschiedene Techniken zur Transfektion von Oberflächen vor.^[6] Die ersten zwei Techniken zeigten keine guten Ergebnisse in Bezug auf die Transfektionseffizienz. DNA-funktionalisierte Kolloide, CaP/

4. Ergebnisse und Diskussion

DNA/HAP zweischalige Partikel und CaP/DNA/CaP/DNA dreischalige Partikel lieferten Transfektionseffizienzen im unteren Bereich, zwischen 2,7 bis 6,1 %. Sehr gute Transfektionsergebnisse konnten mit CaP/PEI-Kolloiden mit aufgetropfter DNA sowie mit CaP/PEI/DNA zweischalige Kolloide erzielt werden. Die Transfektionseffizienz lag bei 70 bis 90 %. Alle hier aufgeführten Oberflächenbeschichtungen wurden aus Alkohol abgeschieden.

4.7.0.8. Zusammenfassung

Die Transfektion von Oberflächen wurde mit aufgereinigten (4.3.1) und nicht aufgereinigten Partikeln (4.3.2) durchgeführt. Es zeigte sich, dass aufgereinigte Partikel nicht so hohe Transfektionseffizienzen erreichen wie nicht aufgereinigte Partikel. Wasser redispergierte Calciumphosphat-Nanopartikel (4.3.3) erreichten die geringste Transfektionseffizienz, sie lag bei 2 %. Calciumphosphat-Nanopartikel konnten nur $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ EGFP-DNA adsorbieren. Sie erreichten allerdings eine höhere Transfektionseffizienz als Wasser redispergierbare Calciumphosphat-Nanopartikel. Es konnte eine Effizienz von 5 % bestimmt werden. Nicht aufgereinigte Partikel zeigten eine höhere Transfektionseffizienz, diese war abhängig von der verwendeten EGFP-DNA Konzentration. Die maximale Transfektionseffizienz wurde mit einer EGFP-DNA Konzentration von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ gemessen. Die maximale Effizienz lag bei $12 \pm 5 \%$. Der Grund für die erhöhte Effizienz lag an der Bildung von PEI-DNA-Polyplexen, die während der Zugabe der DNA mit dem überschüssigen Polymer ausgebildet wurden. Bei der elektrophoretischen Abscheidung wurden geringe Mengen an Polyplexen auf dem Substrat mit abgeschieden. Die Konzentration der Polyplexe lag dabei unter der toxischen Grenze für Zellen. MTT-Tests aller durchgeführten Versuche zeigten eine geringere Zelltoxizität der Nanopartikel gegenüber Lipofectamin.

4.8. Alginatbeads

Alginate bieten durch ihre Biokompatibilität breite Einsatzmöglichkeiten in der Medizin. Sie werden auf verschiedenen Gebieten angewendet und erforscht.^[177–181] Für Alginate gibt es auch verschiedene Anwendungsgebiete außerhalb der Medizin, z.B. im Zusammenhang mit verschiedenen Nanopartikeln in der Wasseraufbereitung.^[182,183] Ein weiteres Gebiet, in dem Alginat angewendet wird, ist das *Tissue Engineering*.^[184,185] *Tissue Engineering* ist die künstliche Erzeugung von biologischen Geweben durch Zellkultur. Dabei werden Zellen entnommen, die dann je nach Zelltyp auf zwei- oder dreidimensionalen Gerüsten kultiviert werden. Mit dieser Methode ist es möglich Herzklappen^[186], Gefäßprothesen^[187], Haut^[188] und Knorpelgewebe^[189] sowie Blutgefäße^[190] herzustellen.

Ein wichtiger Aspekt in Bezug auf verwendete Materialien in der Medizin ist die Qualität und die Reinheit. Die Reinheit eines Implantates oder eines *Scaffolds* ermöglicht eine Implantation ohne eine Immunantwort auszulösen. Das in dieser Arbeit verwendete Alginat ist von sehr hoher Reinheit. Die Herstellung erfolgt am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert. Die verwendeten Braunalgen werden in Chile geerntet und anschließend antimikrobiell behandelt sowie manuell gereinigt. Die weiteren Schritte laufen nach einem optimierten Protokoll ab, es erfolgt anschließend eine Zerkleinerung und Trocknung des Algenrohmaterials. Ein Chelatbildner extrahiert das Alginat aus dem Rohmaterial, anschließend wird durch Filtration und Ethanol- und Kaliumchlorid-Fällungen das Alginat aufgereinigt und isoliert. Der letzte Schritt ist die Trocknung des erhaltenen Alginats, das in diesem Zustand sehr gut gelagert werden kann.^[191]

Die in dieser Arbeit verwendeten Alginatbeads wurden am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert unter sterilen Bedingungen hergestellt. Das getrocknete Alginat wird mit einer Natriumchlorid-Lösung gelöst und anschließend verwendet. Die Vernetzung des Alginats erfolgt mit BaCl_2 . In einer Anlage zur Herstellung von Alginatbeads werden Tropfen von Alginat an einer Kanüle erzeugt, diese werden mit einem Luftschuß abgetrennt. Die Tropfen fallen danach in ein BaCl_2 -Fällbad und vernetzen. Mit dieser Methode können auch grün fluoreszierende Alginat-Dextran-Beads hergestellt werden. Die Beads haben eine Größe von $300\text{ }\mu\text{m}$ bis $600\text{ }\mu\text{m}$ und werden in einer 0,9 % NaCl-Lösung aufbewahrt. Für die weiteren Versuche ist eine definierte Form und Größe der Alginatbeads von Bedeutung.

4. Ergebnisse und Diskussion

In diesem Abschnitt wird die Beladung von Alginatbeads mit biofunktionalisierten Nanopartikeln behandelt. Die Dosis, die bei einer Applikation von bioaktiven Nanopartikeln appliziert wird, ist unbekannt. Es ist nicht möglich die Aufnahme von Biomolekülen, die von Zellen aufgenommen wurden, zu quantifizieren. Weder aus Dispersionen noch von beschichteten Oberflächen.^[192] Um eine definierte Menge an Nanopartikeln zu applizieren, sollten biokompatible Alginatbeads mit bioaktiven Nanopartikeln beschichtet werden. Eine schematische Darstellung der zu erhaltenden Alginatbeadanordnungen wird in Abbildung 4.113 dargestellt.

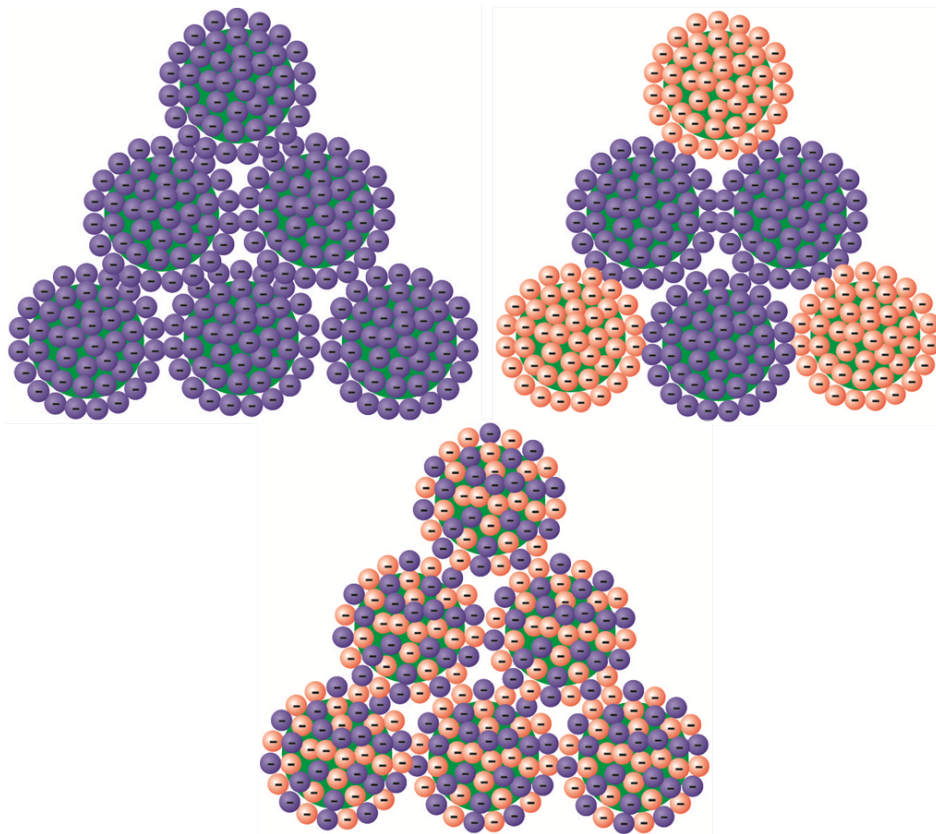


Abbildung 4.113.: Schematische Anordnungsmöglichkeiten von Nanopartikelbeschichteten Alginatbeads zu einfach und mehrfach funktionellen *Scaffolds*. Die unterschiedlichen Farben der Nanopartikel bezeichnen jeweils mit unterschiedlichen Biomolekülen beladene Partikel.

Es wird gezeigt, dass die Alginatbeads mit unterschiedlich bioaktiven Nanopartikeln beschichtet werden sollen und eine Anordnung in einfach und mehrfach funktionellen *Scaffolds* erfolgen soll. Um die Alginatbeads zu beschichten, wurden zwei verschiedene Möglichkeiten verwendet. Die Beschichtung erfolgte zum

4. Ergebnisse und Diskussion

einen mittels einer Nanopartikel Dispersion und zum anderen mit beschichteten Substraten über die die Alginatbeads rollen. Alginatbeads ohne eine Nanopartikel-Beschichtung sind in Abbildung 4.114 dargestellt.

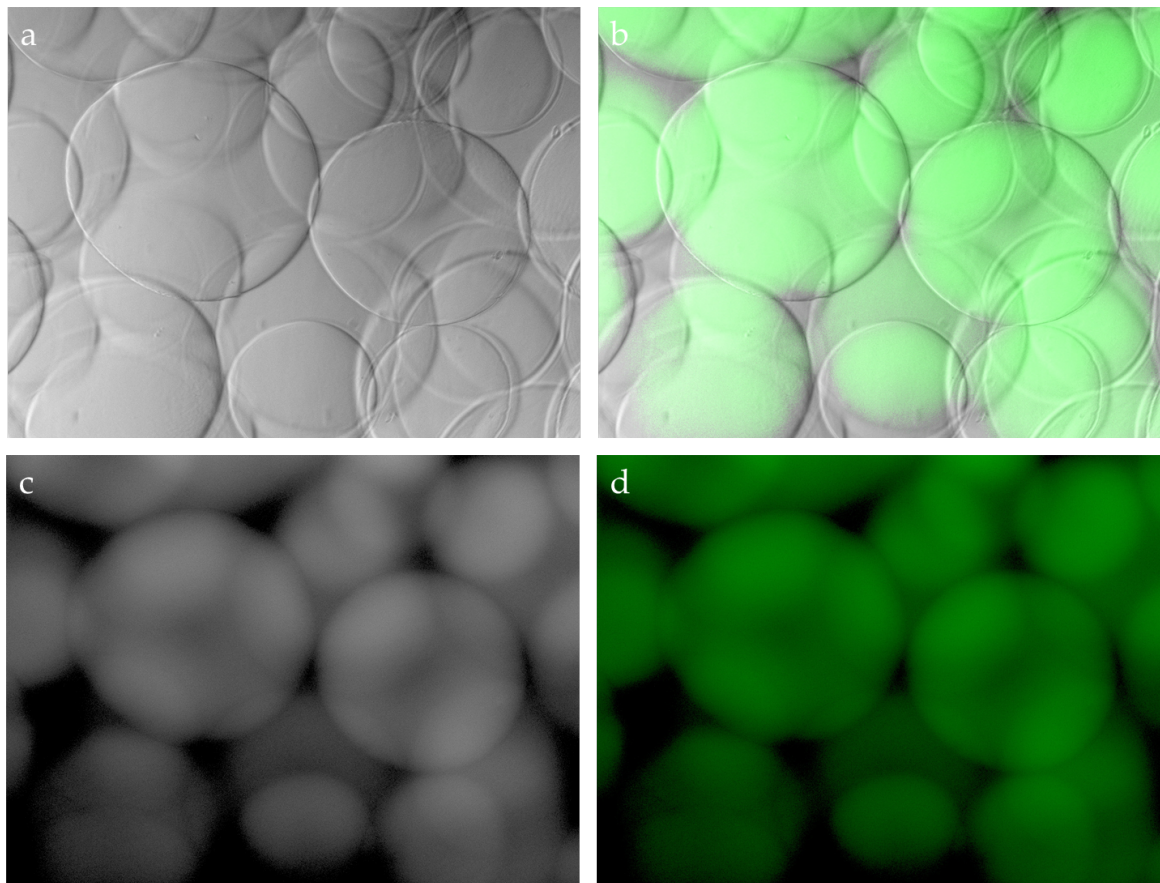


Abbildung 4.114.: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von grün fluoreszierende Alginat-Dextran-Beads.

4.8.1. Beschichtung von Alginatbeads mit Nanopartikeln mittels Dispersionen

Die Beschichtung der Alginatbeads mittels Dispersionen erfolgte mit CaP/PEI/TRITC-Nanopartikeln. Die Herstellung der Partikel ist unter 4.3.4 beschrieben. Die Partikel-Dispersion wurde direkt nach dem Fällen benutzt, ohne die Partikel aufzureinigen. Zu 30 ml Partikel-Lösung wurden 3 ml Alginatbeadlösung gegeben und 1 h lang gerührt. Die überschüssige Lösung wurde nach dem Absetzen der Beads abpipetiert. Die Beads wurden anschließend mit Reinstwasser gewaschen und erneut vom Überstand befreit. Die beschichteten Alginatbeads

4. Ergebnisse und Diskussion

sind in 4.115 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich eine homogene Schicht an Nanopartikeln (rot) um das Bead gelegt hat. Des Weiteren fällt auf, dass das Bead etwas an Form verloren hat. Das liegt an dem freien Calcium, welches sich nach dem Füllen noch in der Lösung befindet. Die anfängliche Vernetzung der Alginate-beads erfolgte mit Bariumionen, um den Calciumgehalt der Partikel bestimmen zu können, die das Bead beschichten.

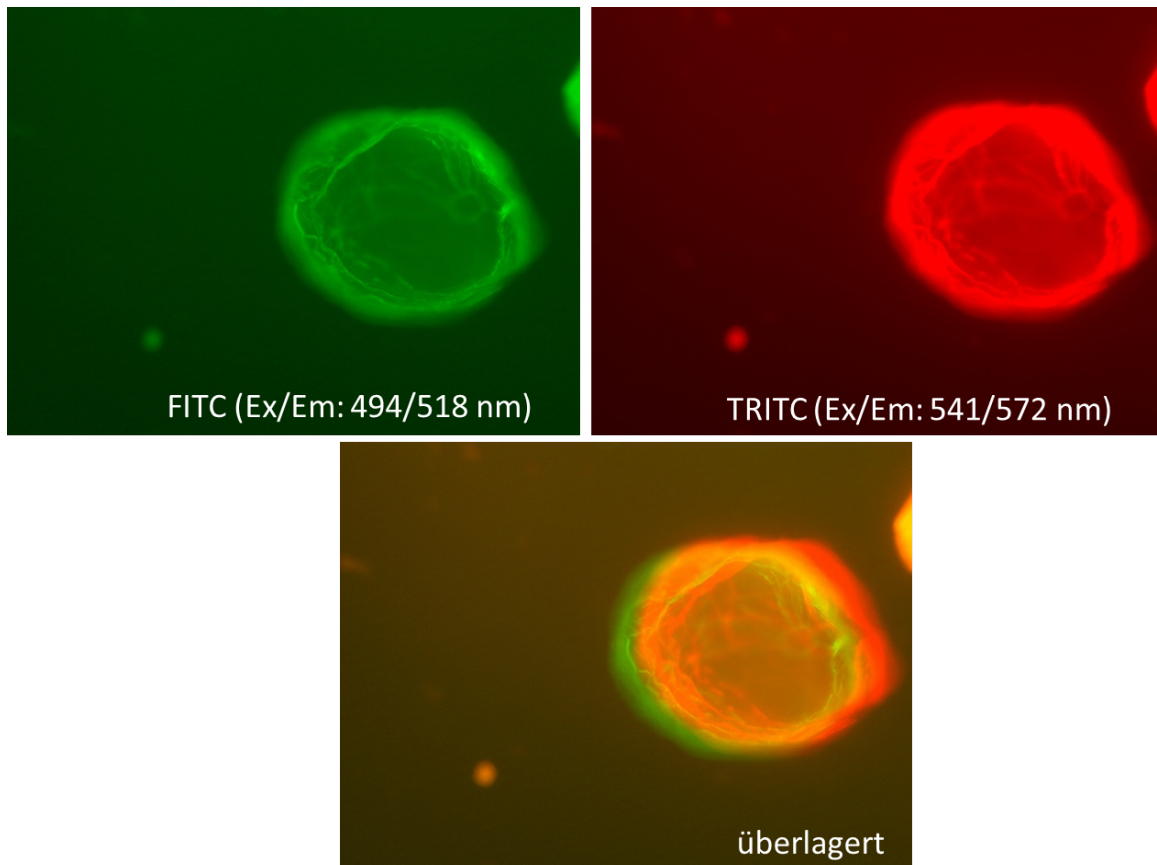


Abbildung 4.115.: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von FITC-markierten Alginatebeads mit einer Beschichtung aus CaP/PEI/TRITC-Nanopartikeln. Die Beschichtung erfolgte aus einer Partikel-Lösung.

Da die Beads bei der Beschichtung aus einer unaufgereinigten Dispersion ihre Form verlieren, wurden Versuche mit aufgereinigten Partikeln durchgeführt. Die Synthese der verwendeten Partikel wurden in Abschnitt 4.3.3 beschrieben. Zu 12,5 ml Partikel-Lösung wurden 6 ml Alginatebeadlösung gegeben und 1 h lang gerührt. Die überschüssige Lösung wurde nach dem Absetzen der Beads abpipetiert. Die Beads wurden anschließend mit Reinstwasser gewaschen und erneut vom Überstand be-

4. Ergebnisse und Diskussion

freit. In Abbildung 4.116 sind die beschichteten Alginatbeads dargestellt. Im Vergleich zu beschichteten Beads aus unaufgereinigten Dispersionen (Abbildung 4.115) verlieren diese nicht ihre Form bei der Beschichtung.

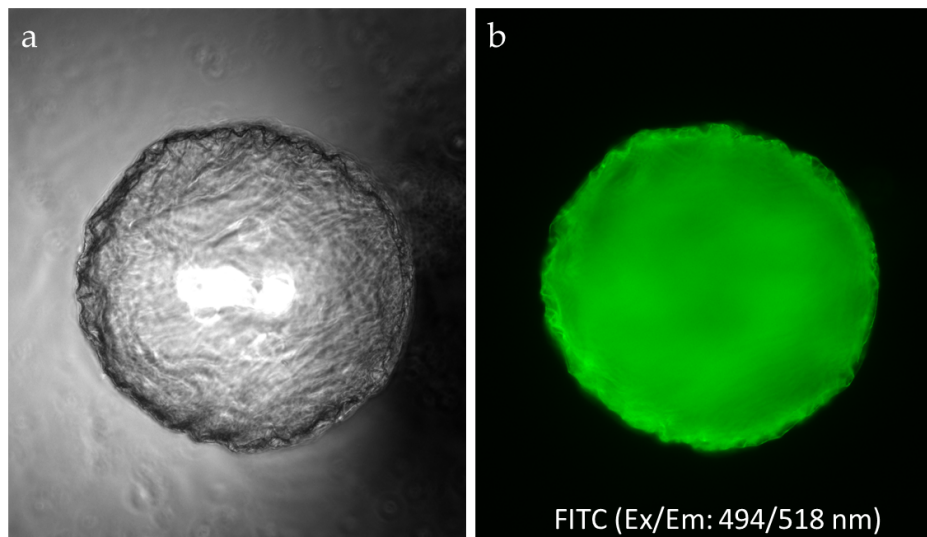


Abbildung 4.116.: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von FITC-markierten Alginatbeads mit einer Beschichtung aus in Wasser redispergierbaren Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die Beschichtung erfolgte aus einer Partikel-Lösung.

In Abbildung 4.117 ist eine REM-Aufnahme beschichteter Alginatbeads zu sehen. Die Beads wurden mittels kritischer Punkttrocknung getrocknet. Die Größe der Beads lag bei ca. 200 μm bis 300 μm . Die Partikel sind zu klein, um sie auf den Beads erkennen zu können.

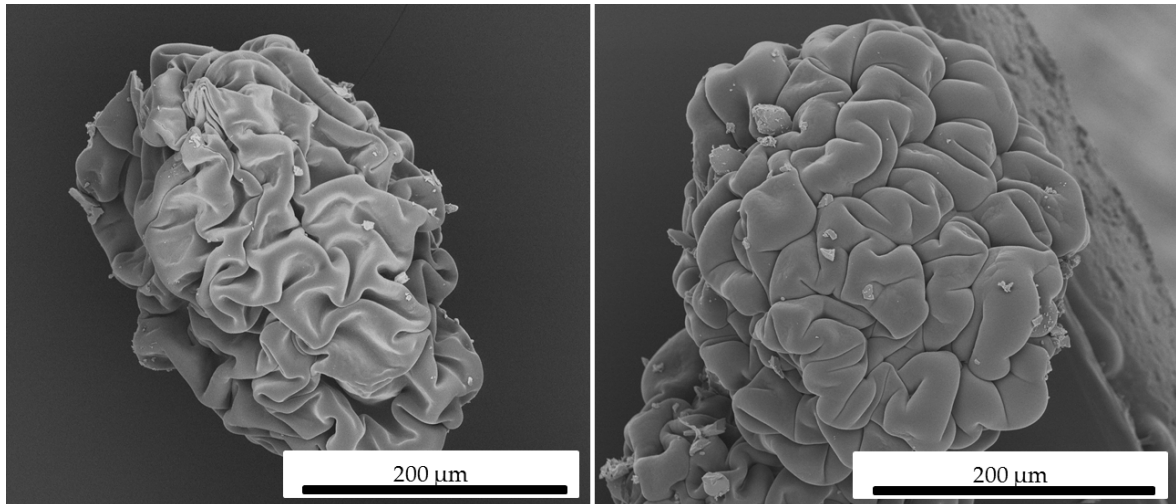


Abbildung 4.117.: REM-Aufnahme von beschichteten Alginatbeads. Die Beads wurden durch kritische Punkttrocknung getrocknet. Die Beschichtung erfolgte aus einer Partikel-Lösung.

4.8.1.1. Berechnung der Calciumphosphat-Nanopartikel Konzentration auf den Alginatbeads

Der Calciumgehalt der beschichteten Alginatbeads wurde mittels Elementaranalyse bestimmt. Aus den erhaltenen Werten lässt sich die Partikel Konzentration wie folgt berechnen:

$$Ca = \frac{\text{Ergebnis der AAS}}{10} \quad (4.9)$$

$$\text{Partikel auf den Beads} = \frac{M(\text{HAP}) \cdot Ca}{M(\text{Ca})} \quad (4.10)$$

mit

$$M(\text{Ca}) = 40 \text{ g mol}^{-1}$$

$$M(\text{HAP}) = 1005 \text{ g mol}^{-1}$$

Die Anzahl der Partikel wurde über die Masse pro Partikel berechnet ($1,65 \cdot 10^{-18}$ kg pro Partikel). Daraus ergibt sich für die Calciumphosphat-Nanopartikel Konzentration und Anzahl, die die Alginatbeads beschichten, folgende Tabellen:

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.8.: Berechnete Calciumphosphat-Nanopartikel Konzentration der Alginate-bead Beschichtung mit freiem Calcium in der Lösung

AAS Ergebnis (Ca) [μg]	Calciumphosphat-Nanopartikel Konzentration für 0,5 mg mL ⁻¹ Beads / μg	Partikel-Anzahl [10^9]
18	15	9
14	12	7
16	13	8

Tabelle 4.9.: Berechnete Calciumphosphat-Nanopartikel Konzentration der Alginate-bead Beschichtung

AAS Ergebnis (Ca) [μg]	Calciumphosphat-Nanopartikel Konzentration für 0,5 mg mL ⁻¹ Beads / μg	Partikel-Anzahl [10^9]
292	122	74
392	164	99

Die Ergebnisse der Berechnungen zeigten eine zehnfach höhere Beschichtung der Alginatebeads mit Nanopartikeln aus aufgereinigten Dispersionen. Das freie Calcium in der Lösung vernetzte die Oberfläche der Alginatebeads, was dazu führte, dass die Beads ihre Form verloren und die Oberfläche nicht mehr so viele Nanopartikel aufnehmen konnten.

4.8.2. Beschichtung von Alginatebeads mit Nanopartikeln von einer elektrophoretisch beschichteten Oberfläche

Die Beschichtung der Alginatebeads von einer Oberfläche erfolgte über elektrophoretisch beschichtete Si-Substrate. Für die Beschichtung wurden CaP/PEI/TRITC- (rot) und CaP/PEI/FITC -Nanopartikel (grün) in Isopropanol redispergiert und bei 50 V 1 min abgeschieden. So wurde ein Substrat mit einer Schichtdicke von ca. 400 nm erhalten. Die Beads wurden anschließend über das beschichtete Substrat gerollt. Bei der Beschichtung mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Partikeln wurden die Beads erst über ein Substrat mit CaP/PEI/TRITC-Nanopartikeln gerollt und danach über ein Substrat mit CaP/PEI/FITC-Nanopartikeln. In 4.118 sind fluoreszierende Alginatebeads mit Nanopartikelagglomeraten (rot) zu sehen. Man erkennt, dass die

4. Ergebnisse und Diskussion

Partikel gut an den Beads haften bleiben, wenn sie über eine beschichtete Oberfläche gerollt werden.

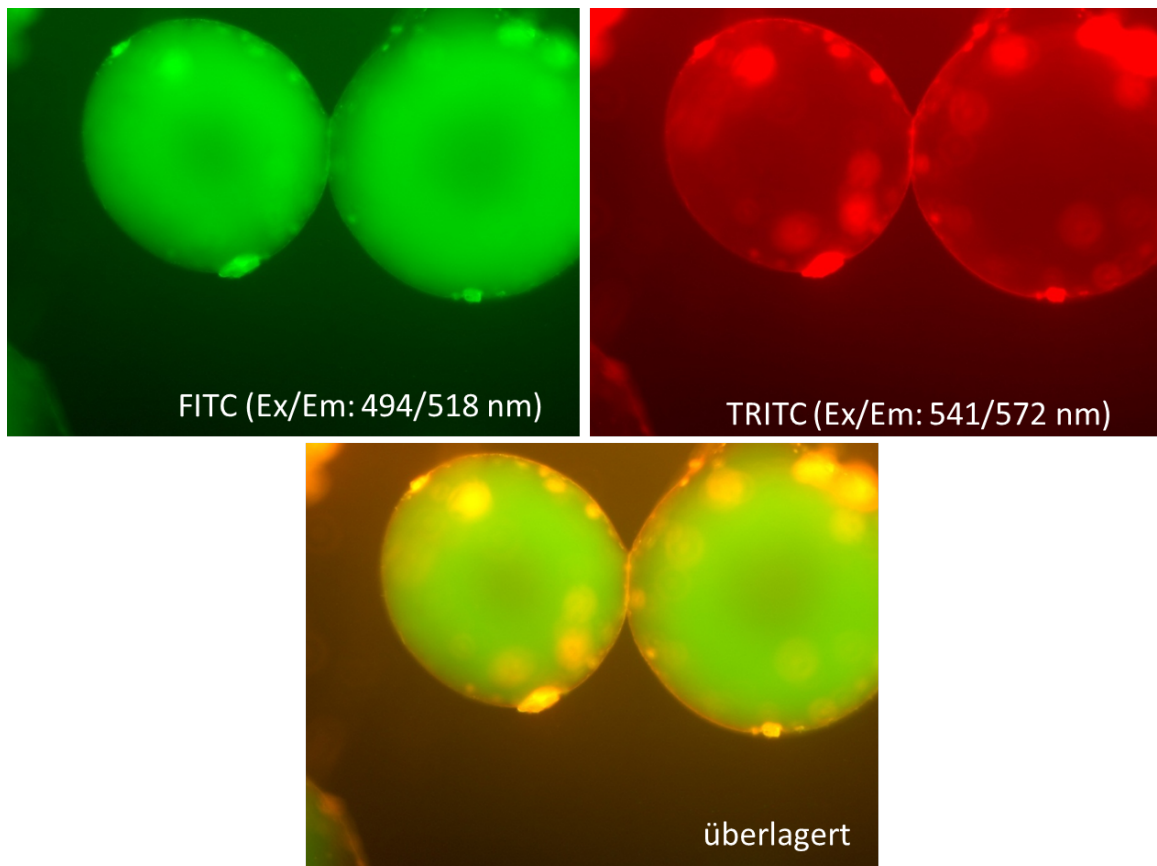


Abbildung 4.118.: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von FITC-markierten Alginatbeads, mit einer Beschichtung aus CaP/PEI/TRITC-Nanopartikeln. Die Beschichtung erfolgte durch Abrollen der Beads über ein elektrophoretisch beschichtetes Substrat.

Die Beschichtung mit zwei verschiedenen Partikelarten wird in den Abbildungen 4.119 und 4.120 dargestellt. Dort sieht man, dass durch die nicht homogene Beschichtung nach einer Beschichtung noch genug freier Platz vorhanden war, um noch bei einer zweiten Beschichtung Partikel aufzunehmen. Die Bilder zeigen verschiedene Tiefenschärfen, um zu verdeutlichen, dass das gesamte Bead mit Partikeln beschichtet wurde.

4. Ergebnisse und Diskussion

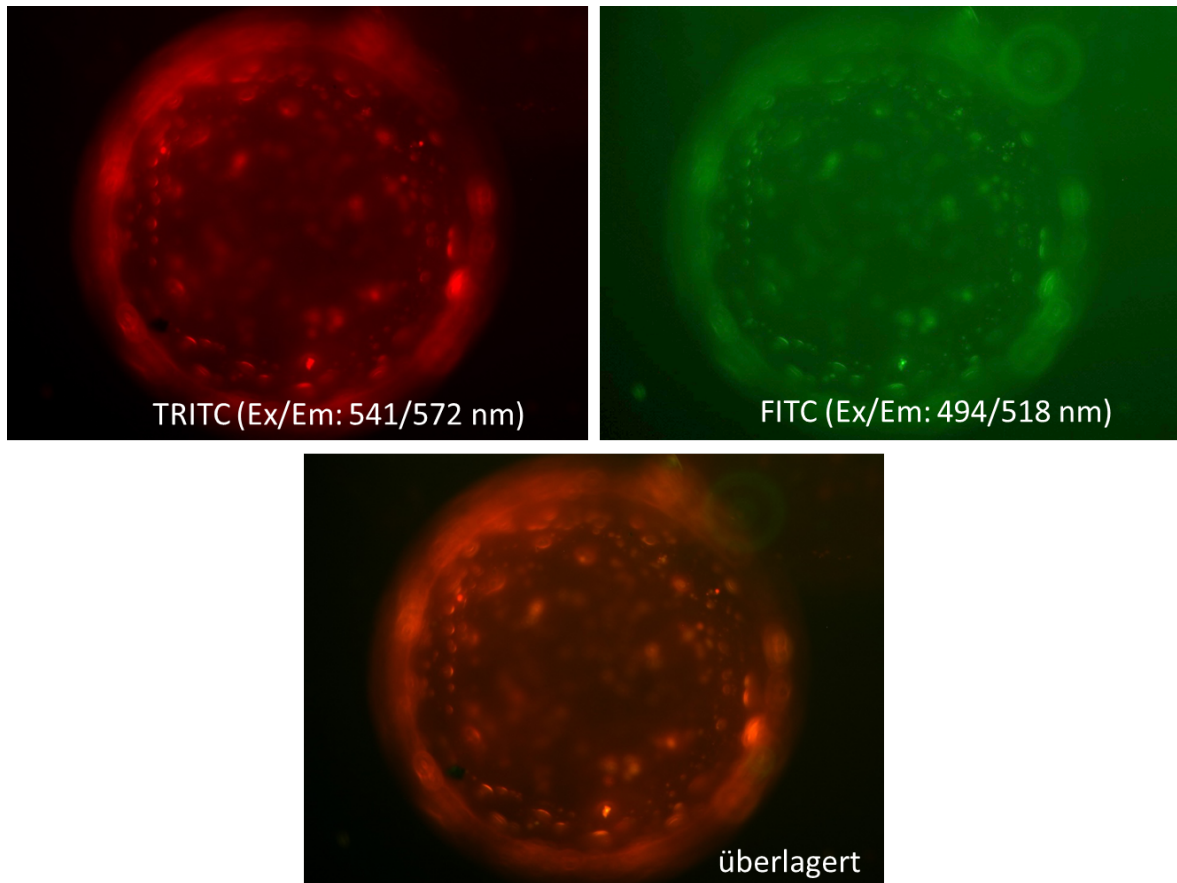


Abbildung 4.119.: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von Alginatbeads, mit einer Beschichtung aus CaP/PEI/TRITC- und CaP/PEI/FITC-Nanopartikeln. Die Beschichtung erfolgte durch Abrollen der Beads über ein elektrophoretisch beschichtetes Substrat.

4. Ergebnisse und Diskussion

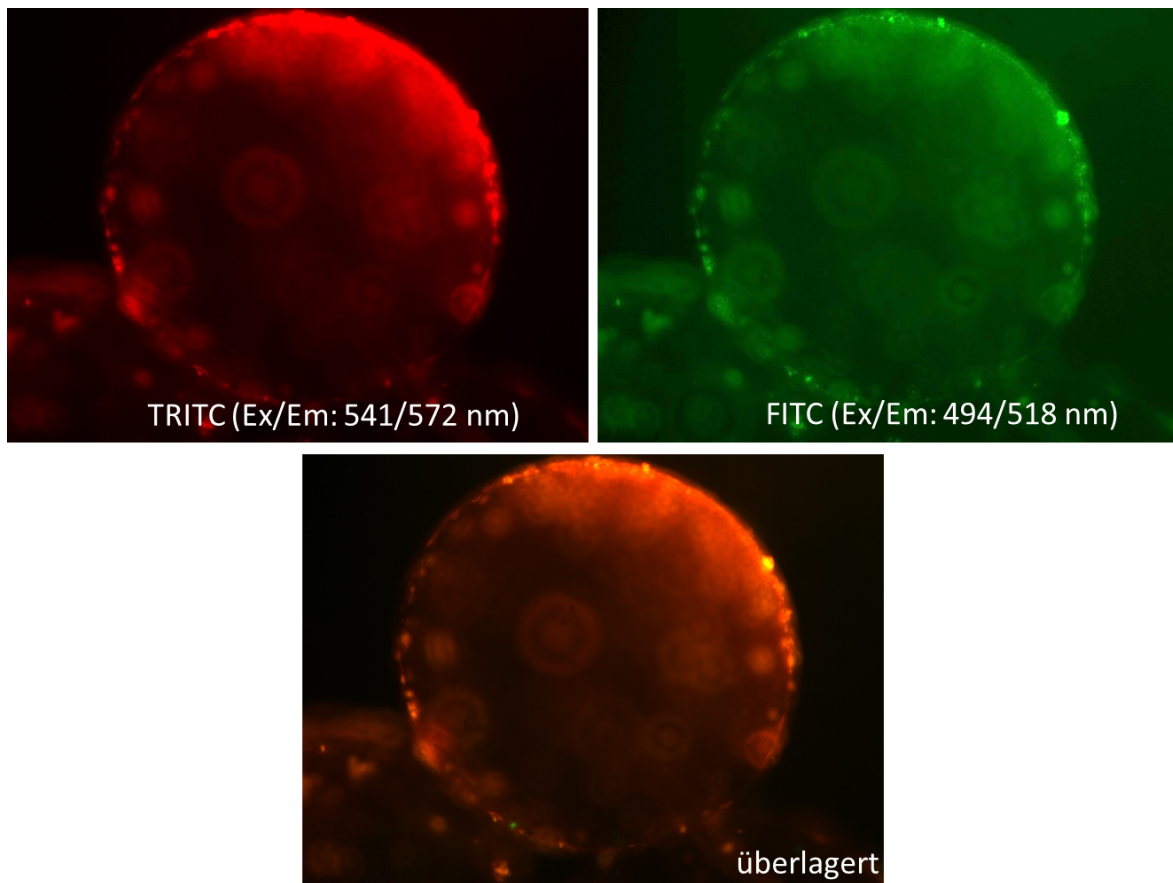


Abbildung 4.120.: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von Alginatbeads, mit einer Beschichtung aus CaP/PEI/TRITC- und CaP/PEI/FITC-Nanopartikeln. Die Beschichtung erfolgte durch Abrollen der Beads über ein elektrophoretisch beschichtetes Substrat.

4.8.2.1. Zusammenfassung

Die Beschichtung von Alginatbeads wurde über zwei verschiedene Arten realisiert. Wenn eine homogene Partikelschicht auf den Alginatbeads erhalten werden sollte, sind diese aus einer Lösung zu beschichten. Eine inhomogene Schicht oder eine Schicht mit verschiedenen Partikelarten konnte am besten mit einer Beschichtung von einer Oberfläche gewährleistet werden. Durch die inhomogene Beschichtung erhielt man eine gute Mischung der verschiedenen Nanopartikel auf einem Bead. Die Berechnung der Calciumphosphat-Nanopartikel Konzentration mit freiem Calcium in der Lösung zeigte eine Beschichtung von 12 bis 15 μg pro 0,5 mg mL⁻¹ Alginatbeads. Eine zehnfach höhere Beschichtung der Alginatbeads konnte mit einer aufgereinigten Dispersion erzielt werden. Durch die Aufreinigung der Dispersion

4. Ergebnisse und Diskussion

konnte eine Veränderung der Bead-Oberfläche vermieden werden, was zu einer Erhöhung der Beschichtungseffizienz führte. Die berechneten Ergebnisse zeigten eine gute Reproduzierbarkeit der Beschichtung aus Dispersionen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für die elektrophoretische Abscheidung aufgezeigt. Im ersten Teil werden Ergebnisse mit thermochromen quecksilberhaltigen Nanopartikeln behandelt. Es sollte gezeigt werden, ob es möglich ist, die Erfahrungen, die mit Disilbertetraiodomercurat-Nanopartikeln gemacht worden sind, auf Quecksilberiodid-Nanopartikel zu übertragen. Es zeigte sich, dass HgI_2 -Nanopartikel ein anderes Verhalten zeigten, als Ag_2HgI_4 -Nanopartikel. Ag_2HgI_4 -Nanopartikel konnten mit fünf verschiedenen Polymeren dargestellt werden. Die Charakterisierung der Partikel wurde mit verschiedenen Methoden durchgeführt: DLS-, Zetapotentialmessungen, REM, XRD, UV/Vis-Messungen und DSC-Messungen.

Die Größe der Nanopartikel war abhängig von der Wahl des Polymers. Mit PAH und PVP konnten die kleinsten Partikel hergestellt werden ($< 70 \text{ nm}$), eine Größe $< 100 \text{ nm}$ konnte mit den Polymeren PAA und PSS erreicht werden. Die größten Partikel wurden mit PSM hergestellt $< 140 \text{ nm}$. XRD-Messungen zeigten keine Verunreinigungen und die Partikel konnten einphasig hergestellt werden. Mittels DSC-Messung konnte die thermochrome Temperatur der Partikel ermittelt werden. Die Größe der Partikel spielte dabei eine Rolle. Für Partikel $< 70 \text{ nm}$ wurde eine thermochrome Temperatur von 43°C bestimmt, Partikel mit einer Größe von ca. 100 nm zeigten eine Phasenumwandlung ab ca. 50°C . Die UV/Vis-Spektren zeigten für alle untersuchten Systeme ähnliche Ergebnisse. Eine elektrophoretische Abscheidung der Partikel war erfolgreich. Es war möglich, die abgeschiedenen Partikel mittels Temperatur und Stromfluss zu schalten. Die Farben der Schichten deckten sich mit den Farben der Dispersion.

Die Darstellung von HgI_2 konnte mit vier Polymeren realisiert werden. Eine Charakterisierung der Partikel erfolgte hierbei mit REM, XRD und DSC. DLS-Messungen zur Größenbestimmung konnten nicht durchgeführt werden, da die Partikel nicht stabil genug waren, daher konnte auch kein Zetapotential bestimmt werden. Die Größe wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmt. Es konnten Größen

5. Zusammenfassung

von 50 - 90 nm für PAA-, PVP- und PSM-funktionalisierte Partikel gemessen werden. Eine Funktionalisierung mit PSS erzeugte kleinere Partikel (30 - 60 nm). XRD-Messungen zeigten, dass nur mit zwei Polymeren einphasige Partikel gefällt werden konnten. Mit PSS war dies mit allen Polymerkonzentrationen möglich, mit dem zweiten Polymer zeigte sich eine Abhängigkeit gegenüber der Polymerkonzentration. Einphasige Partikel waren nur mit einer Polymerkonzentration von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ fällbar. Mit den Polymeren PVP und PSM konnten nur zweiphasige Nanopartikel hergestellt werden. Die Zusammensetzung der zweiphasigen Partikel, funktionalisiert mit PSM, wurde mit Rietveld-Berechnungen bestimmt. Im Ergebnis konnte keine der beiden Phasen isoliert werden.

Die thermochrome Temperatur der Phasenumwandlung wurde für einphasige (PSS-funktionalisiert) und zweiphasige (PSM-funktionalisiert) Nanopartikel mittels DSC bestimmt. Die Phasenumwandlungstemperaturen der einphasigen und zweiphasigen Nanopartikel sind fast identisch, sie lagen bei ca. $135 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit dem einzigen Unterschied im erhaltenen Peak. Der zweiphasige Peak hatte wie erwartet eine Schulter, bedingt durch die zwei Phasen, was den Peak verbreiterte. Eine elektrophoretische Abscheidung der Partikel war nicht möglich. Die Partikel wurden nur vereinzelt abgeschieden und es bildete sich keine ganze Schicht aus.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Beschichtung von Substraten mit biokompatiblen Calciumphosphat-Nanopartikeln. Dafür wurden fünf verschiedenen Calciumphosphat-Nanopartikel Arten eingeführt. Der hydrodynamische Radius der Partikel lag bei ca. 150 nm, für in Wasser redispergierbare Partikel lag der Radius bei 195 nm. Alle Partikel waren elektrostatisch stabilisiert. Das Zeta-potential lag zwischen 25 und 30 mV. Bei den Abscheidungen zeigte sich ein großer Einfluss der Abscheide-Parameter auf die elektrophoretische Abscheidung. Das erhaltene Ergebnis ist abhängig von der Abscheidespannung, Abscheidezeit, Größe der Anode und Abscheide-Substrat. Durch eine Veränderung der Elektrodengröße konnten mehr Partikel in einer geringeren Zeit abgeschieden werden. Die Abscheidespannung ist abhängig vom Abscheidemedium: Partikel in Isopropanol wurden bei einer Spannung von 50 V, Partikel in wässrigen Medien wurden bei 2 V abgeschieden, um eine Elektrophorese des Wassers zu vermeiden. Durch die geringere Abscheidespannung werden weniger Partikel abgeschieden als bei einer Abscheidespannung von 50 V. Die Abscheidezeit spielte ebenfalls eine wichtige Rolle in Bezug auf die zu erhaltende Schichtdicke. Mit einer Erhöhung der Abscheidezeit erhöhte sich auch die Schichtdicke. Es zeigte sich allerdings, dass dieses Phänomen

5. Zusammenfassung

nicht auf wässrige Medien übertragen werden kann. Wenn man die verschiedenen Abscheidesubstrate betrachtete, zeigte sich, dass eine raue Oberfläche in einer besseren Anhaftung der Partikel resultierte. Dies wurde auch mit abgeschiedenen Partikeln aus wässrigen Medien beobachtet. Abscheidungen mit einem kontinuierlichen Flussreaktor ergaben jedoch keine Verbesserung der Abscheidungen. Es konnten keine Monolagen erzeugt werden, auf strukturierten Bereichen wurden aber vermehrt Agglomerate abgeschieden. Alle anderen Abscheidungen mit kontinuierlichem Flussreaktor ergaben inhomogene nicht durchgängige Schichten.

Bei der Abscheidung von biofunktionalisierten Partikeln wurde deutlich, dass die adsorbierte DNA ebenfalls einen Einfluss hatte. DNA < 50 Basenpaare zeigten die besten Abscheideergebnisse. Es konnten homogene Schichten in Form einer Monolage erhalten werden. Dies gilt nicht für DNA > 50 Basenpaare. Mit dieser DNA war es nicht möglich, homogene Schichten zu erhalten. Mit diesen Versuchen sollten die Parameter für die Abscheidungen von EGFP-DNA-funktionalisierte Partikeln ermittelt werden. Diese beschichteten Substrate wurden für die Transfektionsversuche verwendet. Um zu ermitteln, ob die Schichten stabil gegenüber Flüssigkeiten sind, wurden Versuche mit den gleichen Parametern wie bei den Zellversuchen durchgeführt. Die erzielten Schichten sind stabil gegenüber Flüssigkeiten. Die durchgeführten Transfektionsversuche zeigten unterschiedliche Ergebnisse für aufgereinigte Partikel und nicht aufgereinigte Partikel. Der grundsätzliche Unterschied dieser Partikel-Dispersionen lag in der Möglichkeit der Ausbildung von DNA-Polyplexen vor der Abscheidung bei den nicht aufgereinigten Partikeln. Aufgereinigte Partikel ergaben eine geringe Transfektionseffizienz; sie lag bei maximal 5 %. Bei nicht aufgereinigten Partikel konnte dagegen eine maximale Transfektionseffizienz von 12 % beobachtet werden. Dies lag wahrscheinlich an der Ausbildung der DNA-Polyplexen, die mit abgeschieden wurden und ebenfalls Zellen transfizieren können. Die Zellviabilität wurde durch die abgeschiedenen Partikel nicht beeinträchtigt. Die Konzentration der DNA-Polyplexe war sehr gering und lag unter der Zelltoxizität.

Um das Verhalten der Zellen auf Nanostrukturen zu untersuchen, wurden nanostrukturierte Silicium-Substrate mit Zellen besiedelt. Es zeigte sich, dass die Zellen die unstrukturierten Bereiche präferieren. Wenn die Substrate allerdings mit Calciumphosphat-Nanopartikeln beschichtet wurden, konnte eine sehr gute Adhäsion der Zellen auf den nanostrukturierten Bereichen erreicht werden. Da sich jedoch nur wenige Partikel auf den unstrukturieren Bereichen abgeschieden hatten,

5. Zusammenfassung

konnte dort nur eine geringere Expansion der Zellen beobachtet werden. Eine Beschichtung mit Calciumphosphat-Nanopartikel übte insgesamt aber einen positiven Einfluss auf die Zellen aus.

Es wurden Zellversuche durchgeführt, um die Aufnahme von Partikel in die Zelle zu beobachten. Diese Versuche zeigten eine Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die besten Ergebnisse in Bezug auf die maximale Partikelaufnahme erreicht. Eine Erhöhung der Zeit auf 72 h zeigte einen Rückgang der Partikelaufnahme. Einige Zeit nach der Aufnahme der Partikel wurden diese in der Zelle aufgelöst und das Calcium wurde durch Calciumkanäle wieder aus der Zelle gepumpt. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass beide Partikelarten gleichzeitig von den Zellen aufgenommen wurden, wenn zwei verschiedene Schichten an Nanopartikeln nacheinander abgeschieden worden waren. Dies lag an Trocknungsrissen, die nie ganz vermieden werden konnten. Durch diese konnten die Zellen beide Partikelschichten erreichen und aufnehmen.

Der letzte Abschnitt beschäftigte sich mit der Beschichtung von Alginatbeads. Alginatbeads konnten mit Calciumphosphat-Nanopartikeln beschichtet werden. Erfolgte die Beschichtung aus einer Dispersion, erhielt man eine homogene Partikelschicht um die Alginatbeads. Eine Beschichtung von einer elektrophoretisch beschichteten Oberfläche zeigte eine inhomogene Schicht an Partikeln um die Alginatbeads herum. Durch diese inhomogene Beschichtung war es möglich, die Alginatbeads mit unterschiedlichen Partikeln zu beschichten. Auf der Bead-Oberfläche war genügend freie Fläche vorhanden, um weitere Partikel aufzunehmen.

Literatur

- [1] A. R. Boccaccini, S. Keim, R. Ma, Y. Li, I. Zhitomirsky, *J. R. Soc. Interface* **2010**, 7, 581.
- [2] V. A. Kasaj, P. Brita, W. Mainz, *Dental Tribune Swiss Edition* **2009**, 4.
- [3] J. Lee, Y. Kim, U. Jung, S. Choi, *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.* **2012**, 28, 1395.
- [4] R. Moreno, B. Ferrari, *Electrophoretic Deposition of Nanomaterials*, (Hrsg.: J. H. Dickerson, A. R. Boccaccini), Springer New York, New York, NY, **2012**.
- [5] L. Besra, M. Liu, *Prog. Mater Sci.* **2007**, 52, 1.
- [6] H. Urch, *Dissertation; Universität Duisburg-Essen* **2008**.
- [7] M. Neumeier, *Dissertation; Universität Duisburg-Essen* **2011**.
- [8] K. Lee, D. Mooney, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, 37, 106.
- [9] J. Schwiertz, A. Geist, M. Epple, *Dalton Trans.* **2009**, 16, 2921.
- [10] Z. Liu, F. Kiessling, J. Gätjens, *J. Nanomater.* **2010**, 2010, 1.
- [11] V. J. Mohanraj, Y. Chen, *Trop. J. Pharm. Res.* **2006**, 5, 561.
- [12] F. Bensebaa in *Nanoparticle Technologies From Lab to Market*, (Hrsg.: F. Bensebaa), Interface Sci. and Technol. Elsevier, **2013**.
- [13] C. D. Geddes, A. Parfenov, I. Gryczynski, J. R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 9989.
- [14] G. Counio, S. Esnouf, T. Gacoin, *J. Phys. Chem.* **1996**, 3654, 20021.
- [15] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4254.
- [16] C.-L. Chen, N. L. Rosi, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 1968.
- [17] W. Ostwald, *Die Welt der vernachlässigten Dimensionen: eine Einführung in die moderne Kolloidchemie mit besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendungen*, Dresden, Steinkopff, **1915**.
- [18] T. Hofmann, T. Baumann, T. Bundschuh, F. v.d. Kammer, A. Leis, D. Schmitt, *Grundwasser* **2003**, 8, 203.
- [19] T. Hofmann, *Chem. unserer Zeit* **2004**, 38, 24.
- [20] H. Staudinger, A. Schwalbach, *Ann. Chem.* **1931**, 488, 8.
- [21] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, WILEY-VCH Verlag GmbH, **2001**.
- [22] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2002**.

Literatur

- [23] H. D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2002**.
- [24] H. Müller, *Kolloidchem. Beih.* **1928**, 26, 257.
- [25] N. R. Dhar, D. N. Chakravarti, *Kolloid Z.* **1927**, 42, 120.
- [26] M. Thorn, H.-P. Breuer, F. Petruccione, J. Honerkamp, *Macromol. Theory Simul.* **1994**, 3, 585.
- [27] M. Hermansson, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **1999**, 14, 105.
- [28] Z. Adamczyk, P. Weronki, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, 83, 137.
- [29] J. Lyklema, *The Scientific Basis of Flocculation* **1978**.
- [30] S. Dimov, W. Menz, B. Fillon, *4M 2006-Second International Conference on Multi-Material Micro Manufacture*, **2006**.
- [31] F. F. Reuss, *Mem. Soc. Imp. Nat. Moscou* **1808**, 327.
- [32] H. Hamaker, *Trans. Faraday Soc.* **1940**, 36, 279.
- [33] A. R. Boccaccini, I. Zhitomirsky, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2002**, 6, 251.
- [34] C. Kaya, F. Kaya, B. Su, B. Thomas, A. R. Boccaccini, *Surf. Coat. Technol.* **2005**, 191, 303.
- [35] A. Fuchs, *Flockungsverhalten von Latex-Suspensionen bei Adsorption kationischer Polyelektrolyte verschiedener Molmassen und Ladungsdichten*, Herbert Utz Verlag, **1998**.
- [36] E. Hückel, *Physik Z.* **1924**, 25, 204.
- [37] R. Ladenburg, *Ann. Phys.* **1907**, 327, 287.
- [38] B. Michov, *Elektrophorese: Theorie und Praxis*, De Gruyter, **1995**.
- [39] D. C. Henry, *P. Roy. Soc. A-Math. Phy.* **1931**, 133, 106.
- [40] C. G. Sumner, D. C. Henry, *P. Roy. Soc. A-Math. Phy.* **1931**, 133, 130.
- [41] D. Henry, *Trans. Faraday Soc.* **1948**, 44, 1021.
- [42] H. Hamaker, E. Verwey, *Trans. Faraday Soc.* **1940**, 180.
- [43] H. Hamaker, *Trans. Faraday Soc.* **1940**, 186.
- [44] M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1993**, 9, 3408.
- [45] T. Teranishi, M. Miyake, M. Hosoe, *Adv. Mater.* **1997**, 9, 65.
- [46] J.-H. Lee, I.-C. Leu, Y.-W. Chung, M.-H. Hon, *Nanotechnology* **2006**, 17, 4445.
- [47] H. Koelmans, J. Overbeek, *Discuss. Faraday Soc.* **1954**, 52.
- [48] D. R. Brown, F. W. Salt, *J. Appl. Chem.* **2007**, 15, 40.
- [49] F. Bouyer, A. Foissy, *J. Am. Ceram. Soc.* **1999**, 82, 2001.
- [50] Y. Solomentsev, M. Böhmer, J. Anderson, *Langmuir* **1997**, 7463, 6058.
- [51] E. J. W. Verwey, J. T. G. Overbeek, *Produkt-Information Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, General Publishing Company Ltd. Canada, **1999**.

- [52] P. Sarkar, P. Nicholson, *J. Am. Ceram. Soc.* **1996**, 79, 1987.
- [53] H. Wang, S. Zeng, M. Loewenberg, R. Davis, *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, 187, 213.
- [54] H. Wilson, L. Pietraszewski, R. Davis, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 221, 87.
- [55] M. Trau, D. Saville, I. Aksay, *Langmuir* **1997**, 7463, 6375.
- [56] A. R. Boccaccini, O. Van der Biest, R. Clasen, *Electrophoretic Deposition: Fundamentals and Applications*, The Electrochemical Society, Inc. , New Jersey, **2002**.
- [57] J. Andrews, A. Collins, D. Cornish, J. Dracass, *Proc. Br. Ceram. Soc* **1969**, 12, 211.
- [58] P. Biesheuvel, H. Verweij, *J. Am. Ceram. Soc.* **1999**, 55, 1451.
- [59] B. Ferrari, R. Moreno, J. Cuesta, *Key Eng. Mater.* **2006**, 314, 175.
- [60] R. Venkatesh, *Dissertation; TUFTS University* **2009**.
- [61] O. V. der Biest, L. Vandeperre, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1999**, 327.
- [62] M. A. Hickman, R. W. Malone, K. Lehmann-Bruinsma, T. R. Sih, D. Knoell, F. C. Szoka, R. Walzem, D. M. Carlson, J. S. Powell, *Hum. Gene Ther.* **1994**, 1483, 1477.
- [63] H. Herweijer, J. A. Wolff, *Gene Ther.* **2003**, 10, 453.
- [64] B. Schwartz, C. Benoist, B. Abdallah, *Gene Ther.* **1996**, 3, 405.
- [65] R. Kawano, M. Ishizaki, Y. Maeda, Y. Uchida, E. Kimura, M. Uchino, *Mol. Ther.* **2008**, 16, 825.
- [66] H. Hioki, H. Kameda, H. Nakamura, T. Okunomiya, K. Ohira, K. Nakamura, M. Kuroda, T. Furuta, T. Kaneko, *Gene Ther.* **2007**, 14, 872.
- [67] N. Miyagi, V. P. Rao, D. Ricci, Z. Du, G. W. Byrne, K. R. Bailey, H. Nakai, S. J. Russell, C. G. a. McGregor, *J. Heart Lung Transpl.* **2008**, 27, 554.
- [68] M. Stiles, *Basic Biotechnol. eJ.* **2008**, 4, 49.
- [69] U. Griesenbach, *Virus Adaptation and Treatment* **2010**, 2, 159.
- [70] K. Tashiro, *J. Pharm. Soc. Japan* **2011**, 131, 1333.
- [71] W. Touati, P. Beaune, I. D. Waziers, *Cancer Gene Therapy : The New Targeting Challenge*, Techn. Ber., **2010**.
- [72] X. Yao, S. Nakagawa, J. Gao, *Curr. Cancer Drug Tar.* **2011**, 11, 810.
- [73] C. Chen, V. Akerstrom, J. Baus, M. S. Lan, M. B. Breslin, *Virol. J.* **2013**, 10, 86.
- [74] B. L. Ellis, M. L. Hirsch, J. C. Barker, J. P. Connelly, R. J. Steininger, M. H. Porteus, *Virol. J.* **2013**, 10, 74.
- [75] G. Sharma, A. Modgil, B. Layek, K. Arora, C. Sun, B. Law, J. Singh, *J. Controlled Release* **2013**, 167, 1.
- [76] Y. Inoh, T. Furuno, N. Hirashima, D. Kitamoto, M. Nakanishi, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, 49, 1.

- [77] Z. Ziraksaz, A. Nomani, M. Soleimani, B. Bakhshandeh, E. Arefian, I. Haririan, M. Tabbakhian, *Int. J. Pharm.* **2013**, 1.
- [78] F. Jacobs, J. Snoeys, Y. Feng, E. Van Craeyveld, J. Lievens, D. Armentano, S. H. Cheng, B. De Geest, *Gene Ther.* **2008**, 15, 594.
- [79] A. V. Shakhbazov, D. G. Shcharbin, N. V. Goncharova, I. N. Seviaryn, S. M. Kosmacheva, N. A. Kartel, M. Bryszewska, J. P. Majoral, M. P. Potapnev, *Bull. Exp. Biol. Med.* **2011**, 151, 126.
- [80] C. Wang, X. Luo, Y. Zhao, L. Han, X. Zeng, M. Feng, S. Pan, H. Peng, C. Wu, *Acta Biomater.* **2012**, 8, 3014.
- [81] K. Anderson, A. Sizovs, M. Cortez, C. Waldron, D. M. Haddleton, T. M. Reineke, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 2229.
- [82] J. Shen, D. J. Zhao, W. Li, Q. L. Hu, Q. W. Wang, F. J. Xu, G. P. Tang, *Biomaterials* **2013**, 34, 4520.
- [83] K. K. L. Phua, K. W. Leong, S. K. Nair, *J. Controlled Release* **2013**, 166, 227.
- [84] C. Liu, F. Liu, L. Feng, M. Li, J. Zhang, N. Zhang, *Biomaterials* **2013**, 34, 2547.
- [85] L.-L. Li, P. Wu, K. Hwang, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 2411.
- [86] K. K. Hou, H. Pan, G. M. Lanza, S. A. Wickline, *Biomaterials* **2013**, 34, 3110.
- [87] S. D. Jazayeri, A. Ideris, K. Shameli, H. Moeini, A. R. Omar, *Int. J. Nanomed.* **2013**, 8, 781.
- [88] B. Khurana, A. K. Goyal, A. Budhiraja, D. Aora, S. P. Vyas, *Drug Deliv.* **2013**, 20, 57.
- [89] N. Zinder, J. Lederberg, *J. Bacteriol.* **1952**, 679.
- [90] S. Tripathy, H. Black, E. Goldwasser, J. Leiden, *Nat. Med.* **1996**.
- [91] R. G. Crystal, *Science* **1995**, 270, 404.
- [92] M. R. Capecchi, *Cell* **1980**, 22, 479.
- [93] D. Chourrout, R. Guyomard, L. Houdebine, *Aquaculture* **1986**, 51, 143.
- [94] D. Dean, *J. Membr. Biol.* **2013**.
- [95] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, *EMBO J.* **1982**, 1, 841.
- [96] V. Klenchin, S. I. Sukharev, S. M. Serov, L. V. Chernomordik, Chizmadzhev YuA, *Biophys. J.* **1991**, 60, 804.
- [97] T. D. Xie, T. Y. Tsong, *Biophys. J.* **1993**, 65, 1684.
- [98] S. I. Sukharev, V. Klenchin, S. M. Serov, L. V. Chernomordik, Chizmadzhev YuA, *Biophys. J.* **1992**, 63, 1320.
- [99] F. Huang, Z. Fang, J. Mast, W. Chen, *Bioelectromagnetics* **2013**, 34, 253.
- [100] A. Gothelf, J. Gehl, *Hum. Vaccin. Immunother.* **2012**, 8, 1694.
- [101] S. Kale, B. Tyler, *Plant Immunity* **2011**, 712, 153.
- [102] S. Ueki, S. Magori, B. Lacroix, V. Citovsky, *Biolistic DNA Deliv.* **2013**, 940, 17.

- [103] J. C. Sanford, T. M. Klein, E. D. Wolf, N. Allen, *Part. Sci. Technol.* **1987**, 5, 27.
- [104] N. S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell, D. McCabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 9568.
- [105] Y. Cao, B. Zhao, Y. Han, J. Zhang, X. Li, C. Qiu, X. Wu, Y. Hong, D. Ai, J. Lin, Z. Fu, *BioMed. Res. Int.* **2013**, 2013, 952416.
- [106] B. Frame, H. Zhang, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **2000**, 36, 21.
- [107] A. V. Zelenin, V. A. Kolesnikov, O. A. Tarasenko, R. A. Shafei, I. A. Zelenina, V. V. Mikhailov, M. L. Semenova, D. V. Kovalenko, O. V. Artemyeva, T. E. Ivaschenko, O. V. Evgrafov, G. Dickson, V. S. Baranovand, *FEBS Lett.* **1997**, 414, 319.
- [108] R. S. Williams, S. A. Johnston, M. Riedy, M. J. DeVit, S. G. McElligott, J. C. Sanford, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, 2726.
- [109] J. Bertram, *Curr. Pharm. Biotechno.* **2006**, 7, 277.
- [110] H. H. P. Yiu, S. C. McBain, Z. A. D. Lethbridge, M. R. Lees, J. Dobson, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, 92, 386.
- [111] S. Huth, J. Lausier, S. W. Gersting, C. Rudolph, C. Plank, U. Welsch, J. Rosen-ecker, *J. Gene med.* **2004**, 6, 923.
- [112] C.-A. M. Smith, J. de la Fuente, B. Pelaz, E. P. Furlani, M. Mullin, C. C. Berry, *Biomaterials* **2010**, 31, 4392.
- [113] F. L. Graham, A. J. Van der Eb, *Virology* **1973**, 52, 456.
- [114] R. Kingston, C. Chen, H. Okayama, J. Rose, *Curr. prot. mol. biol.* **1990**, 1.
- [115] N. Symens, J. Rejman, B. Lucas, J. Demeester, S. C. De Smedt, K. Remaut, *Mol. Pharmaceutics* **2013**, 10, 1070.
- [116] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, 84, 7413.
- [117] J. McCutchan, J. Pagano, *J. Natl. Cancer I.* **1968**, 41, 351.
- [118] D. Sussman, G. Milman, *Mol. Cell. Biol.* **1984**, 4, 4.
- [119] C. M. Varga, N. C. Tedford, M. Thomas, A. M. Klibanov, L. G. Griffith, D. A. Lauffenburger, *Gene Ther.* **2005**, 12, 1023.
- [120] S. Simões, A. Filipe, H. Faneca, M. Mano, N. Penacho, N. Düzgünes, M. P. de Lima, *Expert. Opin. Drug Del.* **2005**, 2, 237.
- [121] S. McNeil, Y. Perrie, *Expert Opin. ther. pat.* **2006**, 16, 1371.
- [122] D. Fischer, T. Bieber, S. Brüsselbach, H. Elsässer, T. Kissel, *Int. J. Pharm.* **2001**, 225, 97.
- [123] S. Prabha, W.-Z. Zhou, J. Panyam, V. Labhasetwar, *Int. J. Pharm.* **2002**, 244, 105.

- [124] O. Boussif, F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Deme-neix, J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, 92, 7297.
- [125] J. Chen, X. Sun, Z. Yu, J. Gao, W. Liang, *Int. J. Pharm.* **2012**, 422, 510.
- [126] J.-L. Chen, H. Wang, J.-Q. Gao, H.-L. Chen, W.-Q. Liang, *Int. J. Pharm.* **2007**, 343, 255.
- [127] Z. Liu, Z. Zhang, C. Zhou, Y. Jiao, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35, 1144.
- [128] R. Cortesi, E. Esposito, E. Menegatti, R. Gambari, C. Nastruzzi, *Int. J. Pharm.* **1996**, 139, 69.
- [129] M. Thomas, A. M. Klibanov, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 62, 27.
- [130] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H. Elsässer, T. Kissel, *Pharm. Res.* **1999**, 16, 1273.
- [131] V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2008**, 47, 1382.
- [132] D. Olton, J. Li, M. E. Wilson, T. Rogers, J. Close, L. Huang, P. N. Kumta, C. Sfeir, *Biomaterials* **2007**, 28, 1267.
- [133] D. Lee, K. Upadhye, P. N. Kumta, *Mater. Sci. Eng.: B* **2012**, 177, 289.
- [134] C. Kneuer, M. Sameti, E. Haltner, *Int. J. Pharm.* **2000**, 196, 257.
- [135] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D Appl. Phys.* **2003**, 36, 167.
- [136] C. P. Jen, Y. H. Chen, C. S. Fan, C. S. Yeh, Y. C. Lin, D. B. Shieh, C. L. Wu, D. H. Chen, C. H. Chou, *Langmuir* **2004**, 20, 1369.
- [137] D. Evans, F. Theodoulou, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1994**, 48, 43.
- [138] V. S. Anil, P. Rajkumar, P. Kumar, M. K. Mathew, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 3497.
- [139] C. K. Chan, D. A. Jans, *Hum. Gene Ther.* **1999**, 10, 1695.
- [140] W. Schmidt, G. Maass, M. Buschle, *Gene* **1997**, 190, 211.
- [141] G. Löffler, P. Petrides, P. Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer, **2006**.
- [142] C. W. Voet, D. Voet, J. G. Pratt, *Biochemie*, WILEY-VCH Verlag GmbH, **2002**.
- [143] J. H. Day, *Chem. Rev.* **1963**, 63, 65.
- [144] J. H. Day, *Chem. Rev.* **1968**, 68, 649.
- [145] E. Meusel, *Chem. Ber.* **1870**, 3, 123.
- [146] J. A. A. Ketelaar, *Z. Kristallogr.* **1931**, 80, 190.
- [147] J. A. A. Ketelaar, *Z. Kristallogr.* **1934**, 87, 436.
- [148] J. A. A. Ketelaar, *Z. Physik. Chem.* **1934**, 26, 327.
- [149] J. A. A. Ketelaar, *Z. Physik. Chem.* **1935**, 30, 53.
- [150] J. A. A. Ketelaar, *Trans. Faraday Soc.* **1938**, 34, 874.
- [151] S. Hull, D. Keen, *J. Phys.: Condensed Matter* **2000**, 12, 3751.
- [152] J. M. C. V. Fernández, F. Jaque, *Solid State Commun.* **1986**, 59, 803.

- [153] H.-R. C. Jaw, M. A. Mooney, T. Novinson, W. C. Kaska, J. I. Zink, *Inorg. Chem.* **1987**, 26, 1387.
- [154] N. Wiberg, E. Wiberg, A. F. Hollemann, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, De Gruyter, **1995**.
- [155] A. Geist, *Diplomarbeit; Universität Duisburg-Essen* **2009**.
- [156] B. Baranowski, M. Friesel, A. Lundén, *Solid State Ionics* **1983**, 10, 1179.
- [157] M. Friesel, B. Baranowski, *Phys. Rev. B* **1985**, 32, 2506.
- [158] M. Friesel, B. Baranowski, A. Lundén, *Thermochimica acta* **1988**, 131, 191.
- [159] M. Daviti, K. Chrissafis, K. Paraskevopoulos, E. Polychroniadis, T. Spassov, *J. Therm. Anal. Calor.* **2002**, 70, 605.
- [160] T. Abel, F. Kreppel, M. Ogris, H. Büning, *Pharm. unserer Zeit* **2011**, 40, 225.
- [161] M. Eppe, M. Neumeier, D. Dörr, R. Le Harzic, D. Sauer, F. Stracke, H. Zimmermann, *Materialwiss. u. Werkst.* **2011**, 42, 50.
- [162] G. Wolschin, *Hydrodynamik; Rupert-Karls-Universität Heidelberg*, **2013**.
- [163] J. Zhao, X. Wang, L. Li, *Mater. Chem. Phys.* **2006**, 99, 350.
- [164] R. L. Sammons, N. Lumbikanonda, M. Gross, P. Cantzler, *Clin. Oral Implan. Res.* **2005**, 16, 657.
- [165] K. Cai, J. Bossert, K. D. Jandt, *Colloids Surf. B* **2006**, 49, 136.
- [166] M.-H. You, M. K. Kwak, D.-H. Kim, K. Kim, A. Levchenko, D.-Y. Kim, K.-Y. Suh, *Biomacromolecules* **2010**, 11, 1856.
- [167] M. Wieland, M. Textor, B. Chehroudi, D. M. Brunette, *Biomaterials* **2005**, 26, 1119.
- [168] I. Demetrescu, C. Pirvu, V. Mitran, *Bioelectroch. (Amsterdam Netherlands)* **2010**, 79, 122.
- [169] J. Reichert, S. Brückner, H. Bartelt, K. D. Jandt, *Adv. Eng. Mater.* **2007**, 9, 1104.
- [170] Y. Hu, K. Cai, Z. Luo, R. Zhang, L. Yang, L. Deng, K. D. Jandt, *Biomaterials* **2009**, 30, 3626.
- [171] S. Gilles, *Nanoimprint Lithographie als Methode zur chemischen Oberflächenstrukturierung für Anwendungen in der Bioelektronik*, Forschungszentrum Jülich, **2010**.
- [172] T. Ito, S. Okazaki, *Nature* **2000**, 406, 1027.
- [173] R. Le Harzic, D. Dörr, D. Sauer, M. Neumeier, M. Eppe, H. Zimmermann, F. Stracke, *Physics Procedia* **2011**, 12, 29.
- [174] S. Höhm, A. Rosenfeld, J. Krüger, J. Bonse, *J. Appl. Phys.* **2012**, 112, 1.
- [175] R. Le Harzic, D. Dörr, D. Sauer, M. Neumeier, M. Eppe, H. Zimmermann, F. Stracke, *Opt. Lett.* **2011**, 36, 229.
- [176] Z.-Z. Lu, J. Wu, T.-M. Sun, J. Ji, L.-F. Yan, J. Wang, *Biomaterials* **2008**, 29, 733.

Literatur

- [177] A. Atala, L. G. Cima, W. Kim, K. T. Paige, J. P. Vacanti, A. B. Retik, C. A. Vacanti, *J. Urol.* **1993**, 150, 745.
- [178] A. Gutowska, B. Jeong, M. Jasionowski, *Anat. Rec.* **2001**, 263, 342.
- [179] S. S. Pedersen, *APMIS. Supplementum* **1992**, 28, 1.
- [180] D. Tahtat, M. Mahlous, S. Benamer, A. N. Khodja, H. Oussedik-Oumehdi, F. Laraba-Djebari, *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 58C, 160.
- [181] R. K. Das, N. Kasoju, U. Bora, *Nanomed.* **2010**, 6, 153.
- [182] A. Bée, D. Talbot, S. Abramson, V. Dupuis, *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, 362, 486.
- [183] S. Lin, R. Huang, Y. Cheng, J. Liu, B. L. T. Lau, M. R. Wiesner, *Water Res.* **2012**, 1.
- [184] N. L. Francis, P. M. Hunger, A. E. Donius, B. W. Riblett, A. Zavaliangos, U. G. K. Wegst, M. A. Wheatley, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, 1.
- [185] P. Matricardi, C. Di Meo, T. Coviello, W. E. Hennink, F. Alhaique, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, 1.
- [186] A. Haverich, G. Steinhoff, U. Stock, A. Bader, *aerzteblatt.de* **2000**, 1.
- [187] B. H. Walpoth, M. Möller, *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* **2011**, 82, 303.
- [188] Y. et. al Kuroyanagi, *Ann. Plas. Surg.* **1993**, 31, 340.
- [189] C. Brockhausen, R. Zehbe, U. Gross, H. Schubert, C. J. Kirkpatrick, *Biomaterialien* **2006**, 7, 278.
- [190] S. Q. Liu, *Atherosclerosis* **1998**, 140, 365.
- [191] H. Zimmermann, D. Zimmermann, R. Reuss, P. J. Feilen, B. Manz, A. Katsen, M. Weber, F. R. Ihmig, F. Ehrhart, P. Gessner, M. Behringer, A. Steinbach, L. H. Wegner, V. L. Sukhorukov, J. A. Vásquez, S. Schneider, M. M. Weber, F. Volke, R. Wolf, U. Zimmermann, *J. Mat. Sci.* **2005**, 16, 491.
- [192] V. I. Shubayev, T. R. Pisanic, S. Jin, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2009**, 61, 467.
- [193] T. Gockel, *Form der wissenschaftlichen Ausarbeitung*, Springer Verlag, Heidelberg, **2008**.

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
CaP	Calciumphosphat
CPD	<i>critical point drying</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EPD	<i>electrophoretic deposition</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HAP	Hydroxylapatit
HSFL	<i>high spatial frequency LIPSS</i>
LIPSS	<i>laser-induced periodic surface structures</i>
LSFL	<i>low spatial frequency LIPSS</i>
nm	Nanometer
PAA	Polyacrylsäure
PAH	Polyallylaminhydrochlorid
PEI	Polyethylenimin
PDI	Polydispersitätsindex
PSM	Polystyrol-alt-Maleinsäure
PSS	Polystyrolsulfonat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
TG	Thermogravimetrie
TRITC	Tetramethylrhodamin-5-(und 6)-isothiocyanat
UV	Ultraviolett
XRD	Röntgen-Diffraktometrie

A. Eidesstattliche Erklärung

Katrin Wallat
Lunerkamp 36
45139 Essen

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Ich habe alle Stellen, die ich aus den Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommen habe, als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Essen, den 17. Oktober 2013

Katrin Wallat

B. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

C. Vorträge und Publikationen

C.1. Publikationen

K. Wallat, D. Dörr, R. Le Harzic, F. Stracke, D. Sauer, M. Neumeier, A. Kovtun, H. Zimmermann, M. Eppe, "**Cellular reactions toward nanostructured silicon surfaces created by laser ablation**", *Journal of Laser Applications* 24 (2012) 042016

A. Kovtun, S. Neumann, M. Neumeier, H. Urch, R. Heumann, M.M. Gepp, K. Wallat, M. Koeller, H. Zimmermann, M. Eppe, "**Nanoparticle-mediated gene transfer from electrophoretically coated metal surfaces**", *Journal of Physical Chemistry B* 117 (2013) 1550-1555

C.2. Nichtreferierte Publikationen und Abstracts

K. Wallat, M. Neumeier, D. Dörr, R. Le Harzic, D. Sauer, F. Stracke, H. Zimmermann, M. Eppe, "Elektrophoretische Abscheidung von Calciumphosphat-Nanopartikeln auf nanostrukturierten Oberflächen", **Biomaterialien** 12 (2011) 44.

S. Berger, K. Wallat, M. Eppe, "Elektrophoretische Abscheidung von bioaktiven Calciumphosphat-Nanopartikeln", **BioNanoMaterials** 14 (2013) 193.

C.3. Vorträge (V) und Poster (P)

Summer School SPP 1327, Kassel, Germany, 26.09.2011, K. Wallat, M. Neumeier, M. Eppe, D. Dörr, R. Le Harzic, D. Sauer, F. Stracke, H. Zimmermann, "Laser-induced sub-100 nm structures for the generation of bioactive nanoparticle-loaded hydrogels" (P)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e. V. (DGBM), Gießen, Germany, 10.-12.11.2011, K. Wallat, M. Neumeier, M. Eppe, D. Dörr, R. Le Harzic, D. Sauer, F. Stracke, H. Zimmermann, "Elektrophoretische Abscheidung von Calciumphosphat-Nanopartikeln auf nanostrukturierte Oberfläche" (V)

C. Vorträge und Publikationen

Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, Ilmenau, Germany, 18.-20.09.2012, *K. Wallat*, M. Neumeier, M. Epple, D. Dörr, R. Le Harzic, D. Sauer, F. Stracke, H. Zimmermann, "Electrophoretic deposition of calcium phosphate nanoparticles on a nanostructured silicon surface" **(V)**

BMES Annual Meeting, Atlanta, Georgia, 24.-27.10.2012, *K. Wallat*, D. Kozlova and M. Epple, "Electrophoretic deposition of bio-functionalized calcium phosphate nanoparticles" **(P)**

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Erlangen, 26.-28.09.2013, *S. Berger*, *K. Wallat*, M. Epple, "Elektrophoretische Abscheidung von bioaktiven Calcium-phosphat-Nanopartikeln" **(P)**

D. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen angefertigt. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und für die gute Zusammenarbeit.

Insbesondere gilt mein Dank Herr Prof. Dr. Matthias Epple für die Bereitstellung der interessanten wissenschaftlichen Aufgabenstellung.

Prof. Dr. Bettina Siebers danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein Dank gilt Dr. Manuel Neumeier für seine geduldige Einführung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfe bei jeglichen auftretenden Problemen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kooperationspartnern am Fraunhofer-Institut, insbesondere Prof. Dr. Heiko Zimmermann und Dr. Frank Stracke für die vielen konstruktiven Diskussionen. Dr. Ronan Le Harzic danke ich für die Bereitstellung von nanostrukturierten Si-Substraten und M.Sc. Michael Gepp für die Herstellung von Alginatbeads.

Frau Carola Fischer gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung in allen technischen Fragen und für die Anfertigung diverser Geräte sowie ihrer aufmunternden Gespräche.

Frau Ursula Giebel danke ich für ihre ruhige Art und ein offenes Ohr in allen Belangen, sowie ihre Durchführung von REM-Aufnahmen.

Mein besonderer Dank gilt M.Sc. Diana Kozlova für die Durchführung der Zellexperimente und die interessanten Diskussionen.

Mein Dank gilt Dr. Anna Kovtun für die Durchführung von Zellexperimenten.

M.Sc. Kateryna Loza und Dipl.-Ing. Smail Boukercha danke ich für die Anfertigung von REM-Aufnahmen.

Ich danke M.Sc. Johannes Rüsing für die netten und anregenden Diskussionen.

D. Danksagung

Dipl.-Ing. Jürgen Gündel-Graber und Dr. Oleg Prymak danke ich für die Durchführung der XRD-Messungen sowie der Rietveld-Berechnung.

Chemielaborantin Frau Nicola Bloch danke ich für ihre großartige Hilfe.

Dr. Sven Range danke ich für die anregenden Diskussionen.

B.Sc. Sabrina Berger danke ich für die Durchsicht der Arbeit und die anregenden Diskussionen.

Myriam Pesch, Dipl.-Chem. Janina Petrack, Christina Ridder und Dr. Siegfried Walat danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke Dr. Wolfgang Meyer-Zaika für die vielen interessanten Diskussionen.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich während meiner Doktorarbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und immer für mich da waren. Insbesondere meinem Mann Sebastian danke ich für seine Geduld und seine liebevolle Motivation in den letzten Jahren. Des Weiteren danke ich meinem Ehemann für die Erstellung der verwendeten LaTeX Vorlage und seinen technischen Support.

Dieses Dokument entstand aus einer Formatvorlage für Diplomarbeiten an der TU Darmstadt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mühlhäuser, der dankenswerter Weise seine Zustimmung zur Weiterverwendung und Erweiterung dieser Vorlage gegeben hat. Inzwischen sind zahlreiche Änderungen und Erweiterungen eingeflossen, welche die Informatik-Studiengänge am Campus Essen berücksichtigen.

Der vorliegende Text ist auf Basis des Latex-Templates zu^[193] erstellt.

